

Série A, n° 4134
N° d'ordre :
4985

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Annick PASCAUD

PREMIÈRE THÈSE

Métabolisme du cholestérol libre et de ses esters dans
la cellule hépatique et le plasma de Rat

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 31 Mai 1963 devant la commission d'examen

M^{lle} LE BRETON *Président*

M. LEDERER	}	<i>Examineurs</i>
M. ACHER		



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Série A, n° 4134
N° d'ordre :
4985

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Annick PASCAUD

PREMIÈRE THÈSE

Métabolisme du cholestérol libre et de ses esters dans
la cellule hépatique et le plasma de Rat

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 31 Mai 1963 devant la commission d'examen

Mlle LE BRETON	<i>Président</i>
M. LEDERER	} <i>Examineurs</i>
M. ACHER	



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen M. ZAMANSKY

PROFESSEURS

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	JOST	T	Physiologie comparée.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparée.	FORTET	T	Calcul des Probabilités et Physique mathématique.
GRASSÉ	T	Evolution des êtres organisés.	SCHARTZ	T	Calcul diff. et intégral.
PREVOST	T	Chimie organique.	CHOUARD	T	Physiologie végétale.
WYART	T	Minéralogie et Cristallographie.	MALAVARD	T	Aviation (Techn. aéron.)
TEISSIER	T	Zoologie.	BRELOT	T	Calcul diff. et intégral.
MANGENOT	T	Biologie végétale (Orsay)	NORMANT	T	Chimie organique.
AUGER	T	Physique quantique et Relativité.	BENARD	T	Chimie minérale.
MONNIER	T	Physiologie générale.	BUVAT	T	Botanique (E.N.S.).
PIVETEAU	T	Paléontologie	DUGUE	T	Statistiques mathémat.
ROCARD	T	Physique (E.N.S.).	SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.).	ULRICH	T	Physiologie végétale.
LAFFITTE	T	Chimie générale.	MARÉCHAL	T	Optique théor. et appliq.
FAVARD	T	Géométrie supérieure.	KIRRMANN	T	Théories chimiques.
COULOMB	T	Physique du Globe.	CHADEFAUD	T	Botanique.
Mlle COUSIN	T	Biol. animale (S.P.C.N.).	Mlle LE BRETON	T	Physiol. de la nutrition.
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.	SALEM	T	Mathématiques générales.
DRACH	T	Zoologie.	LELONG	T	Application de l'analyse à la Géométrie.
KASTLER	T	Physique (E.N.S.).	DEVILLERS	T	Anatomie et Histol. comp.
EPHRUSSE	T	Génétique.	EHRESMANN	T	Topologie algébrique.
RIVIÈRE	T	Géologie (S.P.C.N.) et Sédim.	FRANCON	T	Physique (S.P.C.N.).
GAUTHIER	T	Biol. végétale (P.C.B.).	GLANGEAUD	T	Géographie physique et Géologie dynamique.
LUCAS R.	T	Recherches Physiques.	GODEMENT	T	Mathématiques (M.P.C.).
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire.	PISOT	T	Techn. math. de la Phys.
ARNULF	T	Optique appliquée.	ROCH	T	Géologie.
MORAND	T	Physique Enseignement.	SCHATZMAN	T	Astrophysique.
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.).	TERMIER	T	Paléontologie stratigraph.
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des Fluides.	ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.
DANJON	T	Astronomie.	LENNUIER	T	Physique (M.G.P.).
PETIT	T	Biologie maritime.	RIZET	T	Génétique.
QUENEY	T	Météorologie et Dynamique atmosphérique.	ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
GALLIEN	T	Embryologie.	Mme TONNELAT	T	Physique théorique.
EICHHORN	T	Botanique.	DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.).
DE CUGNAC	T	Biologie vég. (S.P.C.N.).	SOUCHAY	T	Chimie générale
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie, Physique.	AIGRAIN	T	Electrotechn. générale.
THELLIER	T	Physique du Globe.	BRUSSET	T	Chimie systématique.
L'HÉRITIER	T	Biologie génér. (Orsay).	M. LEVY	T	Phys. théor. des hautes énergies (Orsay).
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay).	Mme CHAIX	T	Chimie biologique.
PONCIN	T	Mécanique générale.	Mme HUREL-PY	T	Biologie végétale (P.C.B.).
DUBREIL	T	Arithm. et Théorie des Nombres.	PIAUX	T	Chimie (M.P.C.).
QUELET	T	Chimie organique.	BRUN	T	Mécanique théorique des Fluides.
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.	LEDERER	T	Chimie biologique.
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire.	Mme DUBREIL	T	Mathématiques (Agrég.).
CUVILLIER	T	Micropaléontologie.	Mme LE LONG	T	Mathémat. II (E.N.S.).
JUNG	T	Pétrographie.	BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.).
TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique.	COTTE	T	Physique électricité.
WIEMANN	T	Chimie organ. et struct.	DUBOIS J.-E.	T	Chimie organique.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et Physique céleste (Orsay).	LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.).
VASSY	T	Physique de l'atmosphère.	MICHEL A.	T	Chimie minérale (Orsay).
DESTOUCHES	T	Théories physiques.	OLMER	T	Energétique générale.
AMIEL	T	Chimie générale.	ROUAULT	T	Electricité (Orsay).
HOCART	T	Minéralogie et Cristallog.	GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.
J.-P. MATHIEU	T	Physique optique.	BARCHIEWITZ	T	Chimie physique.
COUTEAUX	T	Biologie animale (P.C.B.).	BROSSEL	T	Physique atomique.
MAY	T	Zoologie (Orsay).	BUSER	T	Physiologie comparée.
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie.	CAMUS	T	Physiol végét. (B.M.P.V.).
FELDMANN	T	Biologie végétale marine.	CASTAING	T	Physique II Thermod. (Orsay).
			CURIEN	T	Physiol. végétale (Orsay).
			MOYSE	T	Minéralogie et Cristallog.
			NOIROT	T	Evolution des Etres org.
			PANNETIER	T	Chimie générale.
			POSSOMPES	T	Zoologie.
			PULLMANN	T	Chimie quantique.

TEILLAC	T	Phys. nucl. et Radioact.	DAUDEL	T	Mécanique ondul. appli- quée à la Chimie théorique et à la Phy- sique nucléaire.
TONNELAT	T	Biologie physico-chim.	Mlle FOURCROY...		Biologie vég. (S.P.C.N.).
VILLE	T	Econométrie.	Mlle CHOQUET-		
WILLEMART	T	Chimie (P.C.B.).	BRUHAT	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.
DODE	T	Chimie (Orsay).	Mlle VEIL		Physiologie générale.
FREYMANN	T	Recherches physiques.	LWOFF	T	Microbiologie.
GUINOCHET	T	Biologie vég. (S.P.C.N.) (Orsay).	SIESTRUNCK	T	Mécanique physique et expérimentale.
ROLLET	T	Chimie minérale.	LACOMBE	T	Métallurgie des métaux nucléaires.
Mlle JOSIEN.....	T	Chimie (S.P.C.N.).	BROCHARD	T	Physique (P.C.B.) (Orsay).
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et Théorie des groupes.	CABANNES	T	Mécanique générale.
ARNOULT	T	Electronique (Orsay).	LESIEUR	T	Mathémat. I (Orsay).
CHAPELLE	T	Physique (Orsay).	MAZET	T	Mécanique gén. (Orsay).
DELANGE	T	Mathématiques I (Orsay).	CAIRE		Géographie physique et Géologie dynamique.
DENY	T	Mathématiques générales (Orsay).	COMOLET	T	Mécanique des Fluides.
GERMAIN	T	Mécanique théorique des Fluides.	CORABEUF		Physiologie anim. (Orsay).
LUCAS G.....	T	Géologie.	DELLOUE		Physique de l'Exosphère.
ALLARD	T	Chimie physique.	GORENFLOT		Botanique II (Orsay).
BERTHELOT	T	Phys. des Particules fond.	HOUILLOIN		Biologie animale (P.C.B.).
BRICARD	T	Météorologie et Physique de l'Atmosphère.	JULLIEN J.....		Chimie (S.P.C.N.). (Orsay).
Mme ALBE-FESSARD	T	Psychophysiologie.	MALGRANGE	T	Techique math. de la Physique (Orsay).
FRIEDEL	T	Phys. des Solides (Orsay).	OLIVIER		Anthropologie.
M. JULIA.....	T	Etudes des Moléculaires naturelles complexes.	NOZERAN	T	Botanique II (Orsay).
LENDER	T	Biologie anim. (S.P.C.N.) (Orsay).	BLANC-LAPIERRE	T	Physique (E.N.S.) (Orsay).
MAGAT	T	Physico-Chimie des radio- éléments.	CHEVAUGEON	T	Botanique (Orsay).
Mlle QUINTIN....	T	Electrochimie.	KAHANE	T	Mathématiques (Orsay).
MONOD	T	Chimie du métabolisme.	SAMUEL	T	Mathém. (E.N.S.) fémin.
BENOIT	T	Physiol. animale (Orsay).	KOURGANOFF	T	Astronomie (Orsay).
DE POSSEL	T	Analyse numérique.	THIRY	T	Mécanique céleste.
CHARLOT	T	Chimie analytique.	ABELES		Physique (S.P.S.C.N.).
LEMÉE	T	Physiol. végét. (B.M.P.V.) (Orsay).	AMAT		Physique (P.C.B.).
GUÉRIN	T	Chimie (M.P.C.) (Orsay).	AUBOIN		Géologie.
CHATELET M.....	T	Chimie (P.C.B.).	Mme BENOIT-		
JEAN	T	Physique nucl. (Orsay).	GUEUTAL		Phys. nucléaire et radio- activité.
MATTLER	T	Physique (S.P.C.N.).	BOUGIS		Biologie marine (Ville- franche-sur-Mer).
BERGERARD	T	Zoologie (Orsay).	BRUHAT	T	Mathématiques (M.P.C.).
BERTEIN	T	Electronique (Orsay).	BRUNN	T	Géologie histor. (Orsay).
BOUSSIÈRES		Chimie des radio-élé- ments (Orsay).	CHABBAL		Phys. (M.G.P.) (Orsay).
Mme COUTURE....	T	Thermodynamique et Méc. physique.	DEHEUVELS	T	Mathémat. propédeutique (Orsay).
ELLENBERGER	T	Géologie des grandes ré- gions du Globe.	D'ESPAGNAT		Phys. théorique (Orsay).
FRANC	T	Biologie anim. (P.C.B.).	FURON		Géologie (S.P.C.N.).
SCHNELL		Botanique tropic. (Orsay).	Mme GANS.....	T	Génétique.
STOLKOWSKI	T	Physiologie végétale.	GENEVES		Biologie végét. (P.C.B.).
ACHER		Chimie biolog. (Orsay).	GUILBERT		Physique (C.U.S. Orléans).
BAUDOIN		Biologie anim. (P.C.B.).	HUPE		Pétrographie.
BEAUMONT		Biologie anim. (S.P.C.N.).	HOLLANDE	T	Biologie générale.
BLAMONT	T	Géophysique Ionosphère.	LIONS	T	Analyse numérique.
BOURREAU		Botanique.	MAITTE		Chimie (P.C.B.).
CURIE D.....		Physique (M.G.P.).	MEYER		Physique propédeutique.
DURAND-DELGA ..	T	Géologie.	NICOLAS		Géologie appliquée.
FRÉON	T	Chimie organique (Orsay).	PANIGEL		Biologie générale.
HELLER	T	Physiologie végétale.	RAVIER		Pétrographie.
TORTRAT	T	Calcul des Probabilités.	ROSEAU	T	Mécanique théorique des Fluides.
CAILLEUX		Géologie (S.P.C.N.).	ROUBINE		Electronique.
MAGNAN	T	Physique (S.P.C.N.).	SILBER	T	Chimie (P.C.B.).
			UEBERSFELD	T	Electronique.
			YVON	T	Théories physiques.

Secrétaire Général R. POULLAIN

MÉTABOLISME DU CHOLESTÉROL
ET DE SES ESTERS
DANS LA CELLULE HÉPATIQUE
ET LE PLASMA
DE RAT





Ce travail a été poursuivi au Centre de Recherches sur la Cellule Normale et Concréreuse, dirigé par Mademoiselle LE BRETON, Professeur à la Faculté des Sciences.

J'exprime ma profonde reconnaissance et mon affectueux attachement à Mademoiselle LE BRETON, dont les conseils éclairés et la sollicitude de chaque instant m'ont permis de mener à bien ces recherches.

Monsieur LEDERER, Professeur à la Faculté des Sciences, a eu la bienveillance de s'intéresser à mon travail et a accepté de faire partie de mon jury. Je lui en suis reconnaissante.

Monsieur ACHER, Professeur à la Faculté des Sciences, a bien voulu accepter de faire partie de mon jury. Je lui exprime ma gratitude.

Que mes collègues et le personnel du Laboratoire qui m'ont aidée dans la réalisation de ce travail, trouvent ici l'expression de mon amicale et très sincère reconnaissance.

Je tiens à remercier plus particulièrement Madame BRIAN-TAIS de sa collaboration technique, ainsi que Mademoiselle LAURENT qui a assuré la présentation matérielle de ce mémoire.

SOMMAIRE

	PAGES
INTRODUCTION	1-13
Le métabolisme du Cholestérol libre et estérifié.	
Principales données, leur examen critique.	
EXPOSÉ DES RECHERCHES PERSONNELLES	
PREMIÈRE PARTIE	14-27
Techniques utilisées :	
— Méthode de séparation chromatographique des esters de cholestérol, glycérides et cholestérol libre.	
— Méthode d'extraction des acides gras non estérifiés.	
— Mise en évidence d'artefacts d'analyse d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse.	
— Adaptation à l'expérimentation des mesures de radio-activité du cholestérol et des acides gras.	
DEUXIÈME PARTIE	28-48
Relations entre le cholestérol estérifié et le cholestérol libre endogène.	
<i>Chapitre I</i>	29-40
Étude du cholestérol hépatique : synthèse, renouvellement, estérification par les ultrastructures.	
<i>Chapitre II</i>	41-48
Relations entre le cholestérol plasmatique et le cholestérol de la cellule hépatique.	
— Détermination des quantités de cholestérol libre en échanges.	
— Recherche des précurseurs du cholestérol estérifié plasmatique.	
TROISIÈME PARTIE	49-70
Nature et renouvellement des acides gras des esters du cholestérol hépatiques et plasmatiques.	
<i>Chapitre I</i>	49-55
<i>Chapitre II</i>	56-70
Renouvellement des acides gras des esters du cholestérol.	
Recherche des précurseurs de ces acides gras.	
Données apportées par l'étude des vitesses d'incorporation sur l'origine des acides gras dans les divers lipides.	
QUATRIÈME PARTIE	71-74
Interprétation d'ensemble d'après les résultats sur le renouvellement simultané du cholestérol et des acides gras.	
CONCLUSIONS - RÉSUMÉ	75-78

INTRODUCTION

La présence d'esters du cholestérol dans l'organisme a été démontrée par BOUDET [1] en 1835, quelque vingt années après l'identification par CHEVREUL du cholestérol libre.

Bien que, dès 1896, HÜRTLE [2] ait isolé divers esters : oléate, palmitate et stéarate de cholestérol, à partir d'extraits lipidiques de tissus animaux, c'est seulement vers 1940 qu'il est apparu que le linoléate de cholestérol est un constituant lipidique important du plasma humain. Après hydrolyse enzymatique partielle des glycérides, BLOOR et coll. [3], KELSEY et LONGENECKER [4], ont obtenu des fractions d'esters du cholestérol plasmatiques riches en acide linoléique. Selon BLOOR, la plus grande partie des acides gras insaturés du plasma se trouverait dans les esters du cholestérol.

La raison majeure pour laquelle l'étude du métabolisme des esters du cholestérol n'avait pas jusqu'ici progressé, était la difficulté technique de leur séparation d'avec un autre constituant lipidique, les glycérides.

S'inspirant des résultats obtenus par TRAPPE [5] quant au fractionnement chromatographique des divers constituants lipidiques sur colonne d'alumine ou d'acide silicique, divers auteurs ont élaboré des techniques de séparation de ces lipides.

BORGSTRÖM [6], FILLERUP et MEAD [7] se sont attachés à mettre au point une méthode de séparation des esters du cholestérol, glycérides et phospholipides sur colonne d'acide silicique ; nous-même [8] avons mis au point une méthode de séparation quantitative des esters du cholestérol sur colonne d'alumine. Les phospholipides, ainsi que les acides gras non estérifiés, étaient préalablement extraits de notre matériel, car nous avions pour seul but d'isoler, par chromatographie, des esters du cholestérol purs, et d'obtenir ensuite la totalité du cholestérol libre.

La distribution des esters du cholestérol dans l'organisme a toujours frappé les auteurs ; leur teneur est faible dans la plupart des tissus où le cholestérol libre existe cependant en quantité importante ; par contre, dans le plasma et les surrénales, les esters du cholestérol sont plus abondants que le cholestérol libre. A la suite de cette constatation, de nombreux auteurs, dont CAHN et HOUGET [9], BLOOR et coll. [3], FAVARGER [10], POPIAK [11], ont attribué aux esters du cholestérol plasmatiques un rôle actif dans le transport des acides gras, et particulièrement dans le transport des acides gras indispensables. Cette hypothèse a prévalu jusqu'à ces dernières années. Seule l'étude du renouvellement des esters du cholestérol pouvait apporter des faits expérimentaux suffisants pour en prouver le bien-fondé.

D'autre part, les hypothèses attribuant un rôle important au cholestérol et à ses esters dans le développement de l'athéromatose stimulaient la recherche des fonctions physiologiques de ces lipides dans l'organisme.

L'intérêt que les biologistes ont porté aux membranes cellulaires, dès que les particules microsomiales furent identifiées à des fragments de ces membranes, membranes ergastoplasmiques et péricellulaires, et le fait que le cholestérol, associé aux phospholipides, joue un rôle dans la constitution de ces membranes, nous incitaient à étudier le métabolisme du cholestérol dans la cellule hépatique.

Un intérêt supplémentaire se dégageait d'une étude d'ensemble des relations entre le cholestérol de la cellule hépatique et le cholestérol plasmatique, qu'il soit libre ou estérifié.

Ceci nous a conduit à envisager une étude *in vivo* du métabolisme du cholestérol chez le rat.

LE MÉTABOLISME DU CHOLESTÉROL LIBRE ET ESTÉRIFIÉ

PRINCIPALES DONNÉES, LEUR EXAMEN CRITIQUE

C'est au marquage isotopique que l'on doit, depuis une dizaine d'années, un progrès rapide de nos connaissances sur le métabolisme intermédiaire du cholestérol. On lui doit notamment d'avoir facilité la compréhension des étapes du mécanisme de biosynthèse. Depuis les premiers travaux de BLOCH [12] et de CORNFORTH et POPJAK [13] on connaissait les réarrangements moléculaires qui conduisent, par la cyclisation du squalène, à l'élaboration définitive de la molécule de cholestérol. Restait à définir cette longue séquence de condensations, dans le passage de l'acétate au squalène. La découverte, en 1956, par TAVORMINA et GIBBS [14], de l'acide mévalonique comme précurseur, orientait définitivement les recherches vers l'identification des autres composés intermédiaires entre acétate et acide mévalonique et entre acide mévalonique et squalène.

Un autre aspect du métabolisme intermédiaire, le renouvellement moléculaire, est atteint par le marquage isotopique grâce à l'établissement de lois simples acquises expérimentalement. Les promoteurs les plus connus en ont été HEVESY, SHOENHEIMER, RITTENBERG, ANKER, et plus récemment ZILVERSMIT [15]. L'évolution d'activité spécifique en fonction du temps permet de comparer les pourcentages de molécules échangées ou synthétisées et de déterminer les vitesses de renouvellement. A chaque instant, rappelons-le, les vitesses de renouvellement résultent d'un ensemble de processus de synthèses, de dégradations et d'échanges.

En ce qui concerne le marquage du cholestérol il a été obtenu, soit par administration de cholestérol marqué sur le noyau, soit par administration d'un précurseur marqué, généralement l'acétate $1\text{-}^{14}\text{C}$, conduisant à une synthèse de cholestérol uniformément marqué. Le fait que le noyau du cholestérol n'est pas dégradé en CO_2 a grandement facilité l'interprétation du marquage de cette molécule.

Les principaux travaux sur le renouvellement du cholestérol portent sur le cholestérol global (libre + estérifié) ; il existe cependant quelques données sur les rapports d'activité des deux formes de cholestérol dans l'organisme. Le renouvellement d'une molécule d'ester de cholestérol met en jeu le renouvellement de l'alcool et celui de l'acide gras, et l'échange d'une molécule entière exige que les vitesses de renouvellement des deux constituants soient identiques. Pouvant désormais séparer les différents acides gras et mesurer leur activité spécifique, nous avons étudié simultanément le renouvellement du cholestérol et celui de l'acide gras. L'emploi de l'acétate $1-^{14}\text{C}$ s'imposait : l'acide acétique, sous forme d'acétyl CoA, est un précurseur direct des unités élémentaires entrant dans la constitution des acides gras d'une part, du cholestérol d'autre part, à savoir l'acide malonique et l'acide mévalonique.

Ainsi, nous avons voulu, en détectant le comportement des molécules de cholestérol et d'esters du cholestérol dans l'organisme vivant, comparer les activités synthétisantes réelles des divers tissus et observer les phénomènes de transport et les échanges d'un tissu à l'autre.

Avant d'exposer les résultats de nos recherches personnelles, nous traiterons dans ce chapitre des principales données acquises sur le métabolisme du cholestérol libre et estérifié.

SYNTHÈSE DU CHOLESTÉROL.

L'étude du mécanisme de biosynthèse a conduit, comme nous l'avons décrit, à l'identification des différentes étapes intermédiaires. L'isolement d'un nombre toujours croissant d'enzymes catalysant les diverses réactions apporte une confirmation de ces résultats. Nous devons à trois grandes écoles de recherches, BLOCH et coll., POPJAK et CORNFORTH, LYNN et coll., l'aboutissement de cet important travail [16].

Un bref schéma de la localisation des réactions enzymatiques (fig. 1) permet de faire remarquer qu'au sein de la cellule hépatique, les réactions de phosphorylation qui nécessitent l'intervention de l'ATP se font dans le cytoplasme, alors que les étapes de réduction par le TPNH ont lieu au niveau des microsomes. Le terme final de l'élaboration de la

molécule de cholestérol s'effectue dans les microsomes. C'est aussi dans le cholestérol des microsomes et non du cytoplasme que BUCHER [17] observe la plus forte incorporation d'acétate $1\text{-}^{14}\text{C}$ dans le foie, après injection du précurseur à l'animal.

Activité synthétisante des divers tissus.

Presque tous les tissus participent à cette synthèse. La muqueuse intestinale et le foie sont les sites où l'activité synthétisante est la plus élevée, la peau, le poumon, les surrénales, les gonades ont une activité moyenne, tandis que chez l'adulte le tissu nerveux ne métaboliserait que très peu ou pas le cholestérol [18], [19].

D'après VAN BRUGGEN [20], chez un rat de 300 g, 38 mg de cholestérol sont synthétisés journallement, dont 6,5 mg par le foie et 10 mg par la « carcasse ».

Une heure après l'injection d'acétate $1\text{-}^{14}\text{C}$, on trouve de trois à cinq fois plus de cholestérol nouvellement synthétisé dans les tissus extra-hépatiques que dans le foie. Cependant, la muqueuse intestinale mise à part, c'est dans le foie que l'intensité du marquage du cholestérol est la plus forte. L'étude de l'incorporation *in vitro* de l'acétate par des coupes ou des homogénats, confirme ces rapports entre les activités synthétisantes des divers tissus.

Régulation de la cholestérogenèse.

La synthèse du cholestérol hépatique est soumise à un mécanisme de contrôle en retour. Contrôle exercé non seulement par les quantités de cholestérol arrivant au foie, mais aussi indirectement par l'intensité du catabolisme du cholestérol, BERGSTRÖM [21] a démontré que la transformation du cholestérol en acides biliaires est liée à la concentration des acides biliaires du sang portal ; précisons que normalement cette concentration est constante.

A la suite de GOULD et coll. [22], différents auteurs ont observé que l'apport de cholestérol exogène diminue l'incorporation d'acétate dans le cholestérol hépatique ; la cholestérogenèse extra-hépatique n'est toutefois pas modifiée. Ils ont

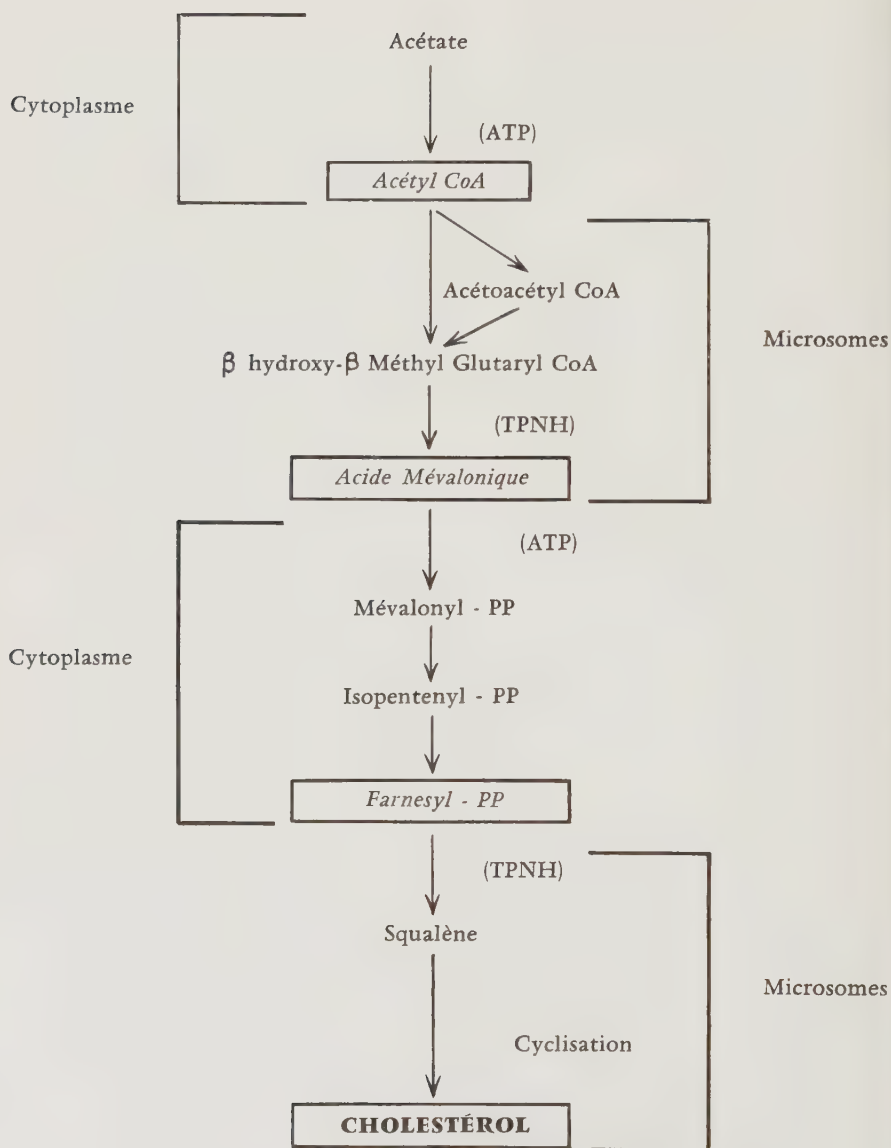


FIG. 1

Localisation de la synthèse du cholestérol
par les ultrastructures de la cellule hépatique.

démonstré [23] que cet effet ne résulte en aucune manière d'une action intermédiaire hormonale, la concentration du cholestérol hépatique étant le facteur déterminant. L'inhibition du pouvoir synthétisant d'homogénats de foie, après ingestion de cholestérol, est beaucoup moins prononcée si l'on part du précurseur acide mévalonique 2-¹⁴C et non de l'acétate. GOULD et POPJAK [24] ont suggéré que le contrôle de la synthèse du cholestérol hépatique s'exercerait sur l'une ou plusieurs des étapes intermédiaires entre acétate et acide mévalonique.

Toutes ces constatations ont été faites dans des conditions expérimentales perturbant le métabolisme normal ou bien encore dans certains cas pathologiques comportant une accumulation de cholestérol dans le foie. Rappelons que, dans les conditions physiologiques, le cholestérol d'origine alimentaire est en quantité négligeable par rapport au cholestérol endogène ; on peut en pratique confondre cholestérol endogène et cholestérol total de l'organisme.

RENOUVELLEMENT DU CHOLESTÉROL.

Les résultats concernant le renouvellement du cholestérol dans l'organisme sont apparemment contradictoires. Ceci provient en partie du fait que les divers auteurs ont utilisé des modes d'investigations isotopiques différents. Alors que les vitesses relatives de renouvellement sont directement atteintes par le marquage isotopique, il est en général difficile de calculer des vitesses absolues, étant donné la diversité des « pools » métaboliques du cholestérol dans l'organisme.

RITTENBERG et SCHOENHEIMER [25] (1937) ont étudié le renouvellement du cholestérol global dans l'organisme par incorporation de D₂O. Chez la souris, la concentration maximale de deutérium incorporé dans le cholestérol représente la moitié de la concentration isotopique maximale de l'eau corporelle. La demi-vie du cholestérol, définie comme le temps requis pour atteindre une activité moitié de l'activité maximale, est évaluée à environ vingt et un jours. En ce qui concerne le niveau de l'équilibre isotopique entre le cholestérol et l'eau de l'organisme, POPJAK et BEECKMANS [26] tiennent compte de la masse importante de cholestérol à peu près inerte que représente le cholestérol du tissu nerveux, et calculent que

la concentration isotopique du cholestérol renouvelable atteint en état stationnaire d'activité 63 % de celle de l'eau corporelle.

Utilisant comme précurseur non plus l'eau deutéronnée mais l'acétate $1-^{14}\text{C}$, PILH et coll. [27], HUTCHENS et coll. [28, 29] ont pu distinguer plus aisément les diverses fractions métaboliques constituant le cholestérol total de l'organisme.

PILH, BLOCH et ANKER [27] étudient l'évolution vers l'état stationnaire d'activité du cholestérol hépatique et du cholestérol de l'animal entier moins le foie, après des injections répétées d'acétate. L'activité spécifique du précurseur en état stationnaire est donnée par la concentration isotopique maximale du dérivé acétylphénylaminobutyrique excrété dans l'urine. D'après les relations entre l'évolution d'activité spécifique du précurseur acétate et celle du cholestérol, les auteurs obtiennent des demi-vies approximatives de trente et un à trente-deux jours pour l'ensemble de la carcasse et des viscères et de six jours pour le foie.

HUTCHENS, VAN BRUGGEN et WEST [28, 29], dans une étude plus poussée sur le renouvellement du cholestérol du foie, de la peau, de l'intestin grêle, du sérum et de la carcasse, recherchent non pas l'évolution vers l'état stationnaire d'activité, mais au contraire la décroissance d'activité après une injection unique d'acétate. L'animal est sacrifié après un temps court mais suffisant pour que l'activité spécifique du précurseur n'interfère plus dans les mesures.

Dans ces conditions, lorsque la décroissance d'activité suit une allure exponentielle, le temps de renouvellement peut être calculé en multipliant la demi-vie par une constante :

$$t = t_{1/2} \times 1,44$$

Nous avons rapporté dans le tableau I, les temps de renouvellement observés par VAN BRUGGEN [29], et nous avons calculé les quantités de cholestérol qui, d'après ces données, seraient renouvelées journalièrement dans les tissus examinés.

Etant donnée l'existence de fractions métaboliques diverses dans le cholestérol de l'organisme entier, il est difficile d'apprécier le renouvellement de ce cholestérol global. c'est-à-dire, d'après la définition même du temps de renouvellement,

TABLEAU I

Quantités de cholestérol renouvelées par vingt-quatre heures
par le rat adulte de 300 grammes

d'après les temps de renouvellement
calculés par VAN BRUGGEN [29]

	Répartition du cholestérol dans l'organisme (en mg)	Temps de renouvellement d'après VAN BRUGGEN (en jours)	Quantités renouvelées par 24 h (en mg)
Sérum (6 ml) .	3,5	3,64	1
Foie (8 g) ...	24	0,91 (12,8) _a	25
Intestin grêle .	11	3 (25,34) _a	3,7
Peau (35 g) ..	140	11,85	12
Carcasse	300	17,20	17,6

a : ces valeurs concernent les temps de renouvellement des fractions lentes.

d'évaluer le temps nécessaire au renouvellement d'une quantité de cholestérol identique à celle qui est présente dans la totalité de l'organisme. Les corrections à apporter doivent se baser sur deux faits : l'existence, d'une part, d'une masse importante de cholestérol non renouvelable (ex. tissu nerveux) et par ailleurs de faibles quantités de cholestérol rapidement renouvelées (ex. foie, muqueuse intestinale).

En ce qui concerne le renouvellement du *cholestérol total* hépatique, aux résultats indiqués précédemment on peut ajouter ceux de LANDON et GREENBERG [30], qui concluent à une demi-vie de vingt-huit heures environ. Ces derniers auteurs, comme HUTCHENS et VAN BRUGGEN, ont étudié la phase de décroissance de l'activité spécifique du cholestérol hépatique. A considérer des valeurs aussi différentes que vingt-huit heures, deux et six jours il est clair que les auteurs n'ont pas atteint les mêmes fractions métaboliques du cholestérol hépatique.

WONG et VAN BRUGGEN [29] ont isolé deux composantes dans la courbe de décroissance d'activité du cholestérol total du foie. La composante rapide correspond à une vitesse de renouvellement de vingt-deux heures, la composante lente à une vitesse de douze jours. Autrement dit, une quantité égale à 110 % du cholestérol hépatique serait journellement renouvelée par un circuit rapide et l'équivalent de seulement 8 % par un circuit lent.

Dans le foie, le renouvellement est directement lié à l'activité synthétisante. Le fait que les quantités de cholestérol renouvelées y sont très supérieures aux quantités synthétisées tient en grande partie à un échange rapide foie-plasma. Le foie déverse dans le plasma du cholestérol qui revient au foie partiellement dilué par le cholestérol extra-hépatique. Le cycle entéro-hépatique représente de même un mécanisme important de ce renouvellement ; 8 à 10 mg de cholestérol sont journellement transportés au foie par la lymphe intestinale chez l'animal à jeun [31]. Ces faits posent le problème de l'origine du cholestérol plasmatique.

ORIGINE DU CHOLESTÉROL PLASMATIQUE.

La distribution dans les lipoprotéines sériques du cholestérol

térol et des autres lipides a été étudiée surtout dans le plasma humain, les données relatives à la constitution des lipoprotéines sériques du rat étant fragmentaires. Toutefois, comme chez l'homme, le cholestérol *estérifié* forme quantitativement la plus importante (3/5 du cholestérol total), se trouve dans les β lipoprotéines denses et dans la fraction légère des α lipoprotéines où sont également localisés les phospholipides. Le cholestérol *libre* est réparti entre les β lipoprotéines, il n'en existe qu'un faible pourcentage dans les α lipoprotéines. Il accompagne donc, dans le transport des lipides, les glycérides plutôt que les phospholipides.

Si l'on admet classiquement que le cholestérol libre plasmatique provient en grande partie du foie, l'origine des esters du cholestérol par contre est très discutée.

Origine du cholestérol libre.

Chez le chien hépatectomisé immédiatement après injection d'acétate $1\text{-}^{14}\text{C}$, GOULD [32] et HARPER et coll. [33] ont observé que l'activité spécifique du cholestérol libre du plasma était pratiquement négligeable : moins de 1 % de celle observée chez le chien intact.

Au contraire, lorsque l'hépatectomie était pratiquée une fois que le cholestérol plasmatique se trouvait marqué, on observait une décroissance de son activité spécifique, résultant d'une dilution par échange avec une réserve de cholestérol non marqué, provenant de tissus extra-hépatiques. Les parts respectives de ces deux origines, hépatique et extra-hépatique, restent encore à préciser.

Origine des esters du cholestérol.

De nombreuses études, parmi lesquelles nous citerons celles de HARPER [33], de ECKLES [34] sur le chien et de GOULD [35] sur l'homme, ont clairement démontré que si le cholestérol libre nouvellement synthétisé apparaît rapidement dans le plasma, le marquage du cholestérol estérifié plasmatique s'effectue très lentement. L'équilibre isotopique entre les deux formes de cholestérol est atteint chez le chien après deux jours, chez l'homme entre la 48^e et la 72^e heure.

Bien que les expériences de GOULD suggèrent que l'estérification se produit dans le plasma, il paraît également probable, d'après les observations de FRIEDMAN et BAYER [35], que les esters du cholestérol plasmatiques proviennent de la sécrétion dans le plasma d'esters synthétisés par le foie. En effet, après hépatectomie, ces auteurs n'observent plus de marquage des esters plasmatiques et tissulaires, alors que le marquage du cholestérol libre des tissus est lui peu affecté.

ZILVERSMIT [37], SWELL et TREADWELL [31] ont signalé une troisième origine : la lymphe intestinale se déversant dans le plasma. Ces auteurs en donnent pour preuve leurs études de l'absorption du cholestérol marqué. Après ingestions répétées, par le lapin, de cholestérol 4-¹⁴C, ZILVERSMIT observe une activité spécifique du cholestérol estérifié supérieure à celle du cholestérol libre. Ce résultat pourrait suggérer que, dans le plasma, le cholestérol libre dérive en partie de l'estérifié, alors que l'inverse est plus vraisemblable.

SWELL et TREADWELL font remarquer que 70 % au moins du cholestérol absorbé se retrouve dans la lymphe, principalement dans les chylomicrons sous forme estérifiée.

Il est cependant bien connu que les chylomicrons de la lymphe sont hydrolysés dans le foie. Leur passage dans le plasma est rapide et dans les conditions normales il y a peu d'échanges entre les chylomicrons d'origine lymphatique et les lipoprotéines sériques [38, 39, 40, 41].

En ce qui concerne l'expérience de ZILVERSMIT, il importe de faire remarquer que les quantités de cholestérol ingérées sont très élevées (1 % du régime). Dans ce cas, le foie de l'animal surchargé de lipides et notamment d'esters de cholestérol [42] ne peut participer comme le foie normal à l'hydrolyse des chylomicrons qui de ce fait s'accumulent dans le plasma. Les chylomicrons n'ayant pas été séparés des lipoprotéines sériques, il semble que l'on doive écarter cette interprétation.

A la lumière des travaux de CHEVALLIER [43] et de FREDRICKSON [44] qui administrent à des rats des doses physiologiques ou même des doses traceuses de cholestérol 4-¹⁴C, on peut définitivement admettre que dans les lipoprotéines plasmatiques les esters du cholestérol ont une activité

spécifique constamment inférieure à celle du cholestérol libre. S'il est vraisemblable qu'il existe des échanges mineurs entre le cholestérol estérifié plasmatique et le cholestérol estérifié lymphatique, on doit plutôt rechercher l'origine des esters du cholestérol soit dans les tissus synthétisant le cholestérol libre, soit dans le plasma lui-même où le cholestérol libre s'équilibre avec le cholestérol tissulaire.

Les effets d'une action *cholestérol estérasique* ont été démontrés *in vitro* dans le foie et dans le plasma. FREDRICKSON [45] obtient par incubation de mitochondries du foie de souris avec du cholestérol 4-¹⁴C, une estérification de 25 % du cholestérol marqué après trois heures. Sur l'estérification du cholestérol dans le plasma nous citerons les travaux antérieurs de SPERRY [46], LE BRETON et PANTALÉON [47], SWELL et TREADWELL [48], WAGNER [49]; LE BRETON et PANTALÉON observent une action couplée: hydrolyse des lécithines, estérification du cholestérol dans le sérum du chien incubé à 37°C.

ALFIN-SLATER et coll. [50] ont observé que l'incorporation des acides gras dans les esters du cholestérol nécessite la présence d'ATP et de coenzyme A.

PREMIÈRE PARTIE

TECHNIQUES D'ANALYSES ET MESURES D'ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE ^{14}C

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES.

Les rats utilisés au cours de ce travail sont des rats mâles Wistar provenant de la souche WAG, âgés de huit à douze mois.

Caractérisés par leur petite taille, le poids relativement faible de leurs organes, ces rats présentent sur le plan du métabolisme des lipides une résistance à la stéatose hépatique.

Dès le sevrage ils sont nourris au régime standard de LE BRETON [51] équilibré en vitamines ; l'apport lipidique est constitué par 10 % de saindoux de composition en acides gras analogue à celle des réserves adipeuses du rat (acide palmitique 26 %, oléique 48 %, linoléique 8 %).

Les animaux sont soumis à un jeûne de douze heures avant l'injection intrapéritonéale d'acétate $1\text{-}^{14}\text{C}$ (acétate de sodium 8 mC/mMole, C.E.A.).

Durant l'incorporation de l'acétate, le CO_2 expiré est collecté sous forme de carbonate de soude. Les collectes sont effectuées chaque quart d'heure au début, puis toutes les heures après la deuxième heure. Nous avons utilisé les méthodes de dosage et de mesure d'activité spécifique du CO_2 expiré décrites par M. PASCAUD [52].

Après des temps variant d'un quart d'heure à douze heures, les rats sont sacrifiés. Le sang est recueilli par décapitation. Notons que cette technique simplifiée nous permet de recueillir au maximum 8 ml de sang sur les 12 ml que contiennent nos animaux, mais elle présente l'avantage d'être rapide et de ne pas causer l'état d'agression avec décharge d'adrénaline qu'entraînent chez l'animal l'immobilisation et la prise de sang. Le foie est perfusé au sérum physiologique

pour éviter la contamination par le sang, les organes et tissus sont prélevés, lavés rapidement et immédiatement broyés dans l'alcool absolu.

SÉPARATION DES CONSTITUANTS LIPIDIQUES.

Les lipides tissulaires sont extraits par la technique classique de Kumagawa.

Certaines de nos expériences ont porté sur les structures cellulaires du foie. Dans ce cas nous avons séparé mitochondries, microsomes et noyaux par centrifugations différentielles (Spinco, à 0°C) suivant les techniques de J. CHAUVEAU [53, 54], de séparation et de purification des structures.

Les graisses libres surnageantes sont séparées du cytoplasme au cours d'une centrifugation préalable.

L'extraction des lipides de chacune de ces fractions cellulaires ainsi que celle des lipides du plasma est effectuée selon BLOOR (ébullition à reflux pendant une heure par le mélange : 3 vol. d'alcool absolu/1 vol. d'éther éthylique). Le résidu protéique est ensuite extrait au Kumagawa par l'éthanol.

On élimine les phospholipides par précipitation acétonique ou par chromatographie sur colonne d'acide silicique en milieu éther éthylique ; les phospholipides sont retenus sélectivement. Notre matériel constitué par les lipides totaux moins les phospholipides sera désigné par NPL (non phospholipides) ; il comprend cholestérol libre, esters du cholestérol, glycérides et acides gras non estérifiés.

Le liquide acétonique ou la solution dans l'éther éthylique sont séchés sous vide, puis le résidu repris à l'éther de pétrole est filtré sur amiante-sable. A partir de cette solution on isole les différents constituants lipidiques.

Les acides gras non estérifiés sont extraits sous forme de savons par le méthanolate N/100 dans de l'alcool à 50°.

Les esters du cholestérol sont séparés des glycérides et du cholestérol libre sur colonne d'alumine.

Nous indiquerons successivement les étapes de ces deux techniques :

Séparation des acides gras non estérifiés (AGNE).

30 ml environ de la solution d'éther de pétrole (pentane) contenant au maximum 150 mg du mélange NPL sont extraits trois fois par 10 ml de méthanolat de KOH N/100 dans du méthanol à 50°. La phase éthérée est lavée jusqu'à neutralité et séchée à l'alcool sous vide. Le résidu repris par du benzène sera chromatographié. La phase hydro-alcoolique contient les AGNE sous forme de savons. On acidifie par ClH au 1/3 et on extrait trois fois par l'éther éthylique. L'éther est lavé, puis séché sous vide à l'aide d'alcool absolu. Les acides gras sont repris par de l'éther de pétrole (E. 30-50°) anhydre et la solution est filtrée sur amiante-sable.

Séparation des esters du cholestérol, du cholestérol libre et des glycérides sur colonne d'alumine.

L'alumine PÉCHINEY (CBT₁) est la seule alumine du commerce que nous ayons retenue pour son pouvoir séparant.

Cette alumine retient fortement les lipides phosphorés et les acides gras libres du fait de leur polarité, et il n'est pas possible de les éluer. Les glycérides et le cholestérol libre sont aussi absorbés mais leur élution par le chloroforme, dans les conditions que nous définirons, est complète.

Les esters du cholestérol en solution benzénique ne sont pas adsorbés par l'alumine.

Préparation de l'alumine. — On l'homogénéise (groses des particules 80-120 meshes), puis on la neutralise par NO₃H dilué. Pour éviter un excès d'acidité on procède de la façon suivante : dans un erlenmeyer on ajoute à 1 vol. d'alumine 6 vol. d'eau ; on agite vigoureusement, on acidifie le surnageant à la touche, on agite à nouveau ; on laisse décanter, on recommence jusqu'au moment où le surnageant, après une demi-heure de décantation, demeure légèrement acide, puis on rince abondamment à l'eau distillée chaude ce qui élimine les particules fines. Après un dernier rinçage au méthanol, l'alumine est activée à l'étuve à 180°C par un séjour de douze heures (sous faible épaisseur). On la conserve ensuite à l'abri de l'humidité.

Préparation de la colonne. — Les rapports entre le poids d'alumine à utiliser et la quantité de lipides à séparer, d'une

part, entre cette quantité de lipides et le volume des solvants d'élution d'autre part, dépendent essentiellement d'un troisième facteur, la concentration des esters du cholestérol dans le mélange.

Rappelons que la teneur de ces esters varie énormément d'un tissu à l'autre, d'un organe à l'autre.

Chez nos rats :

1 ml de plasma contient

0,5 mg d'esters de cholestérol/ 12 mg de NPL,

1 g de foie contient

0,6 mg d'esters de cholestérol/ 15 mg de NPL,

1 g de tissus adipeux contient

0,3 mg d'esters de cholestérol/900 mg de NPL.

Nous donnons ici un tableau (II) qui résume les conditions optimales d'isolement des esters du cholestérol provenant des différents tissus.

Les teneurs en esters du cholestérol analysés dans le plasma et le tissu adipeux représentent les extrêmes, soit respectivement environ 50 % et 0,5 % des graisses neutres. Les concentrations dans le foie, le poumon, la muqueuse intestinale, le cerveau, la peau sont du même ordre, 1 à 5 %.

TABEAU II

Quantités d'alumine et volumes des solvants à utiliser en fonction de la concentration des esters du cholestérol dans l'extrait lipidique

Esters de cholestérol (en %)	Poids du matériel soumis à l'analyse	Poids de l'alumine	Volume de la solution mère benzénique (en ml)	Volumes des solvants d'élution (en ml)	
				Benzène	Chloroforme
50	10 mg 50 mg	5 g	5	15	400
5	10 mg 150 mg	5 g	5	15	400
0,5	500 mg	20 g	200	50	1 000

Ce tableau nous indique que l'alumine adsorbe fortement les glycérides en solution benzénique, et d'autant plus facilement que la solution dans laquelle on passe le mélange sur colonne est plus diluée, les sites d'adsorption se trouvant moins saturés. En conséquence, pour avoir des esters purs, on peut, quand ils sont en très faible concentration, réduire la quantité d'alumine et augmenter le volume de la solution benzénique. Notons cependant qu'une dilution exagérée ne permet plus l'élution des glycérides.

Les colonnes ont un diamètre de 11 mm. A l'extrémité supérieure un rodage femelle permet l'adaptation d'une ampoule. Les robinets de la colonne et de l'ampoule ainsi que l'adaptateur ne sont ni graissés, ni graphités (rodages secs n° 1).

L'alumine est mouillée au benzène, et agitée dans un bécher afin de dégager les bulles d'air adsorbées sur ses particules. Puis on remplit la colonne en évitant qu'elle ne sèche à aucun moment. Un tampon de coton faiblement tassé sert de support à l'alumine. On rince abondamment au benzène. Enfin, on règle approximativement la vitesse d'écoulement du benzène à une goutte par vingt secondes. La lenteur de l'élution benzénique est une condition essentielle de bonne séparation.

Développement de l'élution :

L'application de l'extrait lipidique est effectuée comme nous l'avons indiqué en solution benzénique. Si les conditions expérimentales permettent une grande dilution de cette solution, nous recueillons à la sortie de la colonne une fraction importante des esters du cholestérol ; l'addition d'un volume relativement faible de benzène permet d'en obtenir la totalité. Si au contraire la solution est plus concentrée, l'élution se fera par un volume de benzène trois à quatre fois plus élevé que le volume d'application.

Le chloroforme élué ensuite à la fois cholestérol libre et glycérides. Cette élution est réalisée à une allure rapide.

Par examen en chromatographie en phase gazeuse de la nature des acides gras de fractions successives de l'éluat chloroformique, nous n'avons pas observé d'élution sélective des différents glycérides. Tout au plus, les queues d'élution

peuvent-elles être sensiblement moins riches en acide oléique. Nous avons constaté qu'il n'y a pas d'hydrolyse des glycérides par l'adsorbant alumine.

La qualité de l'isolement des esters de cholestérol sur colonne d'alumine a été vérifiée ultérieurement par analyse sur chromatoplaque d'acide silicique selon une adaptation par MORRIS [55], de la méthode de MALINS et MANGOLD [56].

Obtention du cholestérol, séparation des acides gras.

La saponification se fait par ébullition à reflux de l'extrait lipidique dans une solution de potasse 2 N dans l'alcool à 95°, pendant deux heures. C'est le temps minimum nécessaire à la saponification des esters du cholestérol qui sont difficilement hydrolysables ; les glycérides ainsi d'ailleurs que les phospholipides sont beaucoup plus rapidement saponifiés.

Les savons d'acides gras et la fraction insaponifiable sont ensuite séparés selon la méthode de LEMELAND : après une ébullition de deux heures dans la potasse alcoolique 2 N, on abaisse le titre de la potasse à N/10 dans de l'alcool à 50°, en ajoutant le mélange suivant :

pour 10 ml de KOH 2 N,	{	100 ml ClH 1 N
30 ml du mélange		22 ml eau
		67,5 ml alcool éthylique

On extrait l'insaponifiable à l'éther de pétrole ; les savons demeurent en solution dans la phase hydro-alcoolique. On abaisse le taux de l'alcool par évaporation et dilution à l'eau et on acidifie fortement par HCl au 1/3, les acides gras libérés sont extraits à l'éther éthylique.

Ajoutons une indication utile pour la préparation de la potasse : la potasse concentrée en milieu alcoolique brunit très rapidement et les pigments contaminent les acides gras. On évite cet inconvénient en préparant et en conservant la potasse à froid.

Titration des acides gras.

Les acides gras en solution chloroformique sont titrés par du méthanolate de sodium N/100, en présence de bleu de

thymol [57]. La titration se fait sous azote, après avoir chassé le CO_2 atmosphérique dissous dans le chloroforme. Des quantités de l'ordre de 300 μg d'acides gras peuvent ainsi être dosées avec une précision de 3 %.

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES ESTERS MÉTHYLIQUES D'ACIDES GRAS.

On prépare les esters méthyliques d'acides gras par ébullition une heure et demie à reflux, en milieu méthanol chlorhydrique anhydre. Le méthanol est ensuite évaporé à une goutte près, on reprend par 15 ml d'éther de pétrole et 10 ml d'eau, on décante, on extrait à nouveau la phase aqueuse deux fois à l'éther de pétrole. On neutralise la solution éthérée par du bicarbonate de soude à 2 %, puis on rince à l'eau distillée et on déshydrate sur sulfate de soude. De la même façon la transméthylation se fait directement à partir des triglycérides ou des esters de cholestérol sans saponification préalable.

Les esters méthyliques d'acides gras sont séparés par chromatographie en phase gazeuse selon la technique de JAMES et MARTIN [58, 59], sur phase stationnaire polaire polyéthylène glycol adipate à 179° et sur phase apolaire Apiezon L à 197°. Nous donnons dans le tableau IV les caractéristiques de rétention de ces deux types de colonnes exprimées par les temps d'émergence des différents esters méthyliques rapportés au méthyl-palmitate.

La présence dans les esters du cholestérol plasmatiques, de quantités importantes (6 à 7 % des A.G.) des acides 22 C 5 Δ et 22 C 6 Δ n'a pu être décelée correctement que par analyse sur Apiezon. Pour les temps de rétention élevés, les pics sur colonne de polyester sont très étalés et se confondent avec la ligne de base. Au contraire, l'acide lignocérique (24 C saturé) est plus facilement repéré sur polyester ; d'une façon générale, les différents esters méthyliques d'acides gras saturés et insaturés allant du myristique à l'arachidonique sont mieux séparés sur phase polyester.

Ces analyses sont effectuées sur chromatographe MARTIN à détecteur « balance de densité de gaz » (thermocouple pallador).

Le débit d'azote est de 40 ml/mn, l'excès de pression au

sommet de la colonne étant de 750 g/cm². Une telle analyse relativement lente s'impose si l'on désire collecter séparément les différents esters.

Lorsqu'on veut simplement déterminer leur radioactivité, les esters méthyliques d'acides gras marqués sont directement collectés à la sortie de l'appareil sur scintillateur solide anthracène. Les mesures d'activité ¹⁴C sont effectuées au spectromètre Packard (Tricarb, modèle 314 E X). Si l'on désire pratiquer une analyse complémentaire (hydrogénation, oxydation, décarboxylation ultérieures), ou les réinjecter, on utilise un trappeur à - 70°C (précisons que, sur phase polyester, les vapeurs d'esters méthyliques qui émergent de la colonne sont toujours souillées d'un peu de phase stationnaire).

Ces deux formes de collecteurs mis au point par M. PASCAUD [60], nous permettent de capter au moins 90 % des vapeurs.

Nous pensons devoir insister sur la nécessité d'effectuer l'analyse des esters méthyliques d'acides gras sur les *deux types de phase stationnaire polaire et apolaire*, afin d'écartier toute erreur d'interprétation. En effet, dans l'analyse des acides gras des esters du cholestérol, notamment ceux des mitochondries et noyaux hépatiques, nous avons noté l'importance d'un composé (jusqu'à 50 % de l'ensemble des esters) assimilable, si on ne tient compte que de son émergence sur polyester, à l'eicosatriénate de méthyle (20 C 3 $\Delta^{8, 11, 14}$). Or, ce composé migre sur apiezon comme le méthyl palmirate (fig. 2). Il ne peut donc s'agir d'un ester méthylique d'acide gras.

D'après les temps de rétention sur les deux phases stationnaires, nous nous sommes assurés qu'il ne s'agit ni de cholestérol, ni d'autre stéroïde contaminant, ni de squalène, non plus que d'ubiquinone, tous corps que l'on trouve dans les substances insaponifiables des structures cellulaires. Il ne s'agit pas non plus de produits de dégradation éventuels de ces molécules sous l'effet de la température (180°C).

Nous avons observé ce composé par analyse directe en chromatographie gazeuse de l'extrait lipidique. Ce corps ne possède donc pas de groupe carboxylique libre susceptible d'être méthylé.

TABLEAU III

Temps d'émergence, relatifs au méthyl palmitate,
d'esters méthyliques d'acides gras

Acide	Structure	Phases stationnaires	
		Polyéthylène glycol-adipate 179°	Apiezon L 197°
laurique	12 C	0,25	0,18
myristique	14 C	0,49	0,43
	15 C	0,71	0,66
palmitique	16 C	1	1
palmitoléique . .	16 C 1 Δ 9	1,13	0,88
margarique . . .	17 C	1,40	1,52
stéarique	18 C	1,98	2,37
oléique	18 C 1 Δ 9	2,25	2,04
linoléique	18 C 2 Δ 9, 12	2,69	1,92
	19 C	2,75	3,64
γ -linoléique . . .	18 C 3 Δ 6, 9, 12	3,02	1,92
linolénique	18 C 3 Δ 1, 12, 15	3,51	1,92
arachidique . . .	20 C	3,86	5,4
	20 C 1 Δ	4,20	4
	21 C	5,3	8,5
eicosatriénoïque	20 C 3 Δ 5, 8, 11	5,40	3,7
	8, 11, 14	5,76	3,7
arachidonique .	20 C 4 Δ 5, 8, 11, 14	6,40	3,45
	20 C 5 Δ	8,5	3,45
béhénique	22 C	7,8	13
	22 C 1 Δ	8,2	
lignocérique . . .	24 C	15,5	23,2
	22 C 5 Δ	16,7	
	22 C 6 Δ	18,5	7,3

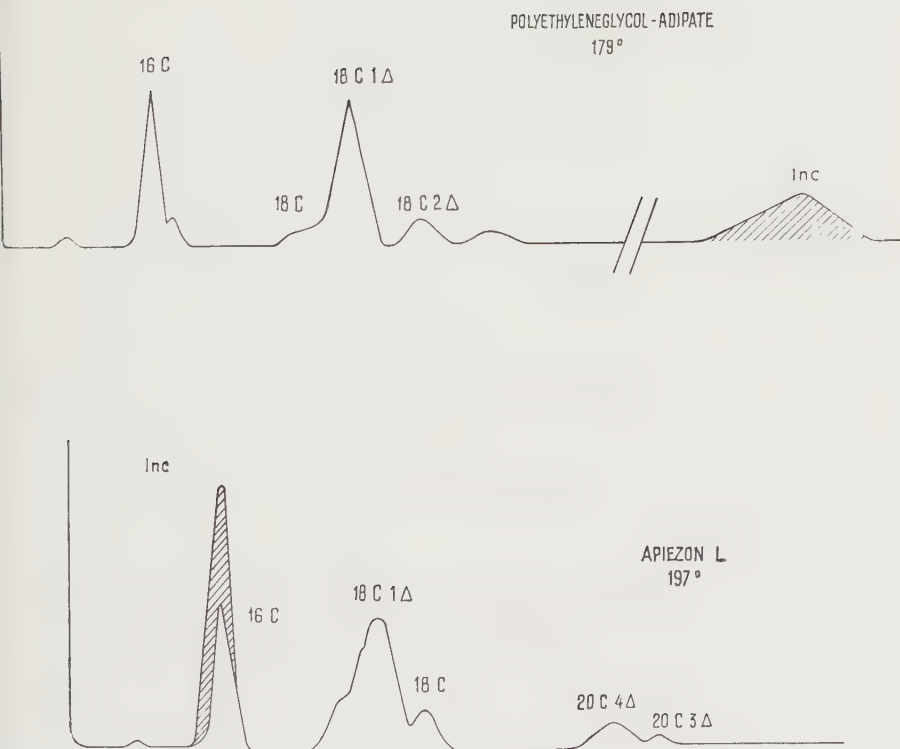


FIG. 2

Chromatogrammes d'analyse d'esters méthyliques d'acides gras
mettant en évidence
un composé inconnu (Inc) distinct de l'eicosatriénoate de méthyle.

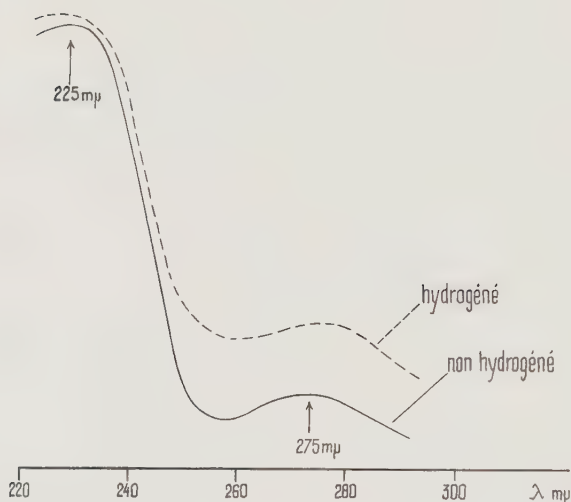


FIG. 3

Spectre d'absorption en ultra-violet du composé inconnu (solvant méthanol).

Après hydrogénation, sous pression d'une atmosphère, suffisante pour saturer les doubles liaisons des chaînes aliphatiques, nous n'avons pas observé de modification de ce composé, son temps de migration demeurant inchangé.

Le spectre d'absorption en ultra-violet (fig. 3) révèle deux maximums à 225 et 275 $m\mu$, indice d'une fonction cétone ou ester. Le spectre infra-rouge (fig. 4) confirme la présence du groupement carbonyle: absorption (faible), à $2\,720\text{ cm}^{-1}$. L'absorption à $2\,950\text{ cm}^{-1}$ est très faible, ce qui révèle un nombre restreint de groupes méthylène. Au contraire, la très forte absorption vers $1\,530\text{ cm}^{-1}$ suggère une nature cyclique pour ce composé. Enfin, l'analyse élémentaire (une seule analyse portant sur environ 2 mg) a donné: C 69,99 %, H 8,14 %).

L'identification de ce composé inconnu, vraisemblablement artefact d'extraction des lipides, exige de plus grandes quantités, jusqu'ici non disponibles, pour être menée à bien.

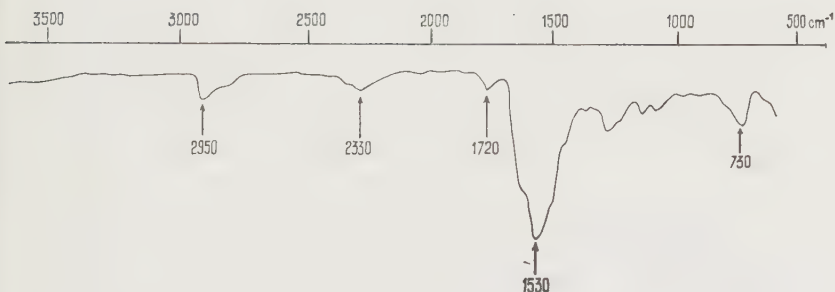


FIG. 4
Spectre d'absorption en infra-rouge du composé inconnu
(solvant tétrachlorure de carbone,
cellule de référence contenant le polyester collecté).

MESURE DE L'ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE ^{14}C DES ACIDES GRAS.

La réponse du détecteur étant linéaire, l'enregistrement des pics (enregistreur Graphispot) donne, à un facteur de correction près pour le poids moléculaire, des surfaces proportionnelles au poids des esters collectés à la sortie. Pour les esters méthyliques d'acides gras allant de 14 C à 22 C, les facteurs correctifs différant de moins de 2 %, pratiquement on n'en tient pas compte.

Le détecteur est étalonné par application d'une quantité connue de méthyl palmitate et on calcule la surface correspondant à 1 μmole d'acide palmitique.

L'activité de l'échantillon, mesurée soit au scintillateur, soit au « Flow Counter », est rapportée à la μmole de l'acide considéré. Pour permettre la comparaison d'une série de rats à l'autre, cette valeur est rapportée à l'activité de l'acétate injecté pour 100 g de rat.

$$\text{act. spéc. acide gras} = \frac{\text{nbre d'impulsions}}{\text{nbre de moles}} \times \frac{1}{\text{activité injectée}}$$

MESURE DE L'ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE DU CHOLESTÉROL.

Les méthodes de mesure de la radioactivité du CO_2 , gazeux ou sous forme de carbonate de barium, après oxydation des molécules de cholestérol, sont des techniques délicates, à rendements variables.

Nous avons mis au point une méthode simple et facilement reproductible de mesure de l'activité du complexe cholestérol-digitonine en pellicule fine dans un « Flow Counter » sans fenêtre.

Les prises de cholestérol libre, de l'ordre de 100 à 500 μg , en solution dans le mélange de Caminade (73 % acétone, 9 % d'alcool et 18 % d'eau), sont précipitées par 1 ml d'une solution à 0,2 % de digitonine dans le solvant de Caminade, ajoutée goutte à goutte à ébullition. Après refroidissement, le complexe est filtré sur disque de papier filtre dur, SCHLEICHER et SCHÜLL n° 1575.

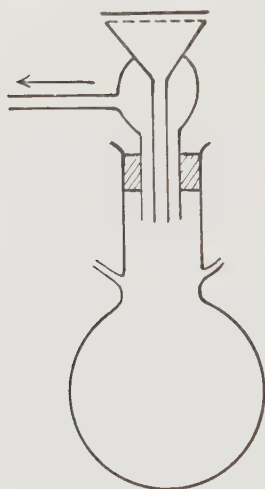


FIG. 5

Le dispositif de filtration sous vide (fig. 5) doit être maintenu parfaitement à l'horizontale. Chaque des filtrations se fait sur une double épaisseur de papier pour éviter l'accentuation des dépôts au niveau des perforations du verre support.

Nous obtenons ainsi une pellicule fine, d'épaisseur homogène qui, étant donné la qualité du papier, n'y pénètre pas, ce qui permet de travailler en couche mince.

La courbe expérimentale d'auto-absorption est déterminée à l'aide de cholestérol ayant une forte activité spécifique, synthétisé *in vitro* par la muqueuse intestinale, dans les conditions suivantes :

Incubation à 37°C pendant trois heures de 2 g de cellules de muqueuse dans 20 ml de tampon Krebs-Ringer bicarbonate

contenant 100 μ moles d'acétate de Na (20 μ moles d'acétate de Na $1\text{-}^{14}\text{C}$ ($1\mu\text{C}/\mu\text{mole}$) diluées par 80 μ moles d'acétate inactif.

Les facteurs de correction d'auto-absorption (tableau IV) sont très faibles pour les quantités allant jusqu'à 500 μg de cholestérol, soit environ 2 mg du complexe cholestérol-digitonine. Pour des quantités croissantes, ils sont calculés graphiquement par le rapport entre l'activité sans auto-absorption, repérée sur la tangente à la courbe expérimentale à l'origine, et l'activité mesurée.

La mesure est effectuée dans le flow-counter sans fenêtre Tracerlab SC 16 qui convient parfaitement pour les mesures de radioactivité de solides : rendement 34 % (du même ordre que le rendement d'un compteur à scintillations), mouvement propre variant de 19 à 24 imp/mn.

De même que pour les acides gras, on calcule l'activité spécifique molaire rapportée à la dose d'acétate injecté pour 100 g de rat.

$$\text{act. spéc. cholesterol} = \frac{\text{nbre d'impulsions}}{\text{nbre de moles}} \times \frac{1}{\text{activité injectée}}$$

Ce mode d'expression permet de comparer les activités respectives de la molécule de cholestérol et de la molécule d'acide gras qui l'estérifie.

TABLEAU IV

Facteurs de correction d'auto-absorption f_c
en fonction du dépôt de complexe cholestérol-digitonine
valeurs rapportées à la quantité de cholestérol présente
dans le complexe (pds cholestérol = pds complexe $\times$ 0,2431)

Quantité de cholestérol μg	f_c	Quantité de cholestérol μg	f_c
300	1,017	700	1,096
350	1,03	750	1,10
400	1,04	800	1,112
450	1,045	850	1,120
500	1,057	900	1,132
550	1,058	950	1,152
600	1,072	1 000	1,165
650	1,08		

DEUXIÈME PARTIE

RELATIONS

ENTRE LE CHOLESTÉROL ESTÉRIFIÉ ET LE CHOLESTÉROL LIBRE ENDOGÈNE

L'importance toute particulière présentée par les esters du cholestérol plasmatiques nous a conduit à orienter notre travail d'une part sur les relations existant dans le plasma entre le cholestérol estérifié et le cholestérol libre, d'autre part sur les relations entre le cholestérol plasmatique et celui des tissus, qu'il soit libre ou estérifié.

De tous les tissus qui participent à l'échange de cholestérol avec le plasma, le foie joue un rôle exceptionnel du fait qu'il met très rapidement en circulation le cholestérol nouvellement synthétisé. Il est donc possible de dissocier les échanges plasma-foie et plasma-tissus extra-hépatiques.

L'étude simultanée du renouvellement du cholestérol dans le plasma et dans le foie nous permettra, entre autres, de calculer le pourcentage de cholestérol du plasma synthétisé par le foie, de déterminer les vitesses des échanges, d'où les quantités de cholestérol plasmatiques renouvelées journellement par échanges rapides avec le foie, et par échanges plus lents avec le cholestérol des autres tissus.

On ne peut considérer le cholestérol hépatique comme un ensemble homogène. La part du cholestérol à renouvellement rapide, qui représente la majeure partie des échanges avec le plasma et le cycle entéro-hépatique, doit elle-même être considérée comme un ensemble de fractions métaboliques correspondant aux diverses structures cellulaires ; ceci du reste, est vrai pour le cholestérol de chacun des tissus. Il nous a donc paru nécessaire de rechercher quels sont les compartiments du cholestérol hépatique avec lesquels le cholestérol libre et le cholestérol estérifié du plasma sont susceptibles de s'échanger.

C'est en fonction de ce problème que nous avons fixé les conditions d'investigation isotopique : comparaison des évolutions d'activité spécifique jusqu'à la douzième heure après une injection unique d'acétate.

Cette limitation de la durée d'incorporation du précurseur, relativement courte quand il s'agit du renouvellement du cholestérol, a pour but avant tout de comparer les activités synthétisantes en phase croissante d'activité, ce qui nous permettra de distinguer les niveaux de synthèse pour les diverses structures de la cellule hépatique. Bien qu'une investigation de courte durée présente l'inconvénient de limiter la précision de l'étude des vitesses de renouvellement en phase de décroissance d'activité, et ceci d'autant plus que la décroissance de l'activité spécifique se fait plus lentement, elle permet cependant une meilleure approximation des résultats en raison de conditions physiologiques propres à l'estérification du cholestérol.

En effet, dans des conditions normales, pour une espèce animale donnée, le rapport $\frac{\text{chol. estérifié}}{\text{chol. libre}}$ est constant et spécifique de chacun des tissus et du plasma. Par contre, après un jeûne prolongé au-delà de vingt heures, dans le cas du rat, nous avons observé un déplacement de cet équilibre se traduisant par une augmentation notable du cholestérol estérifié dans le foie. Etant donné que les calculs du mode de renouvellement tels que nous les appliquons sont fondés sur l'hypothèse de l'état stationnaire des constituants de l'organisme, il est nécessaire d'éliminer dans les expériences tout facteur amenant une variation des concentrations de ces constituants.

CHAPITRE I

Étude du renouvellement du cholestérol hépatique

Dans une première étape, nous avons étudié le renouvellement du cholestérol libre et l'incorporation du cholestérol libre nouvellement synthétisé dans les esters du cholestérol

du foie entier. Nous avons ensuite recherché quels sont les sites de synthèse et d'estérification du cholestérol.

Les expériences concernant le foie total ont été reproduites deux ou trois fois sur des lots comprenant de trois à six rats selon le temps d'investigation. Par contre, pour l'étude de l'incorporation d'acétate dans les différentes structures cellulaires, nous avons dû nous limiter à une seule série d'expériences, portant sur une série de six rats pour chaque point expérimental. Le CO_2 expiré est collecté séparément pour chacun des animaux en expérience.

Nous donnerons les moyennes des résultats, les valeurs extrêmes étant représentées sur la courbe. Les résultats concernant les activités spécifiques des deux formes de cholestérol dans le foie entier sont groupés dans le tableau V. Les courbes d'évolution d'activité sont représentées par les figures 6 et 7.

1° Examen de l'évolution d'activité spécifique du cholestérol du foie entier.

CHOLESTÉROL LIBRE.

Après une montée relativement rapide de la courbe, correspondant à l'incorporation du précurseur actif, nous observons un maximum vers la troisième heure, suivi d'une décroissance lente.

L'examen de la phase décroissante de cette courbe doit nous permettre de calculer les grandeurs relatives au renouvellement du cholestérol. Représentée en coordonnées semi-logarithmiques, on vérifie que cette décroissance est du type exponentiel. Graphiquement on évalue la demi-vie à vingt-cinq heures, ce qui donne un temps de renouvellement d'environ trente-six heures, donnée voisine des résultats obtenus par LANDON et GREENBERG [30], mais, rappelons-le, pour VAN BRUGGEN [29], le temps de renouvellement serait deux fois plus élevé.

Devant la variabilité des résultats obtenus par les divers

auteurs, nous avons été amené à rechercher si certaines des conditions physiologiques auxquelles les rats sont soumis ne peuvent être à l'origine de ces différences. Il nous a paru intéressant, entre autres, d'étudier l'effet de la température d'expérience sur l'incorporation du précurseur acétate ^{14}C dans le cholestérol.

On sait que la majeure partie de l'acétate est oxydée en CO_2 éliminé par la respiration. Alors qu'un rat de 300 g expire environ 17 mmoles de CO_2 par heure lorsqu'il est placé à la température de 20°C , cette quantité de CO_2 est fortement abaissée pour des températures élevées supérieures à la neutralité thermique (28°C) ; 12 mmoles à 32°C . A cette température de 32°C , nous observons des activités spécifiques du cholestérol hépatique deux à trois fois plus élevées que celles observées à 20°C . Par contre, l'activité spécifique du CO_2 expiré reste du même ordre de grandeur (tableau VI), ce qui montre que l'activité du précurseur acétyl-CoA ne varie pas. L'accroissement de l'activité spécifique du cholestérol correspond donc à un accroissement de la synthèse, partant à un renouvellement accéléré.

L'influence de la température ainsi que l'influence du temps de jeûne auquel est soumis l'animal permettent d'expliquer en partie les écarts entre les vitesses de renouvellement rapportées par les auteurs.

Le temps de renouvellement de la composante rapide varie de un à deux jours, celui de la composante lente de neuf à douze jours, dans les limites des régulations physiologiques propres à chaque souche de rat.

CHOLESTÉROL ESTÉRIFIÉ.

D'après la courbe d'évolution d'activité spécifique du cholestérol estérifié (fig. 7), il apparaît que l'estérification du cholestérol libre hépatique est un processus lent. L'activité spécifique croît régulièrement et atteint à la sixième heure une valeur maximale, alors que le cholestérol libre, rappelons-le, marque dès la deuxième heure une activité élevée qui se prolonge jusqu'à six heures après l'injection d'acétate, avec un maximum vers la troisième heure.

De plus, l'activité spécifique du cholestérol estérifié demeure inférieure à celle du cholestérol libre tout au long de la courbe. D'après les relations entre précurseur et dérivé on peut donc admettre que le cholestérol estérifié n'est pas en équilibre pour sa totalité avec le cholestérol libre hépatique, c'est-à-dire qu'une part du cholestérol estérifié du foie a une origine extra-hépatique.

TABLEAU V

**Activité spécifique du cholestérol libre
et du cholestérol estérifié du foie entier**

act. spéc. = imp/mn par μ mole,
rapportée à l'activité injectée p. 100 g de rat

	Temps d'incorporation (en heures)					
	1/4 h	1 h 1/2	2	3	6	12
act. spéc du cholestérol libre	1,99		10,79		10,44	
		8,5 6,5	12,1 8,9	12,12 11,6	11,3 11,5	9,3
	1,99	7,5	10,6	11,86	11	9,3
act. spéc du cholestérol estérifié	0,1		5,2		7,8	
		2,45	3,92 2,7	5,4 3,5	9,4	7,2
	0,1	2,45	3,9	4,4	8,6	7,2

TABLEAU VI

**Effet de la température
sur l'oxydation de l'acétate 1-¹⁴C en CO₂ expiré par le rat**

Température	CO ₂ expiré	
	m moles/heure/100 g	activité spécifique 0-1/4 h
20°C (7 anx)	5,21	101
32°C (4 anx)	3,96	105

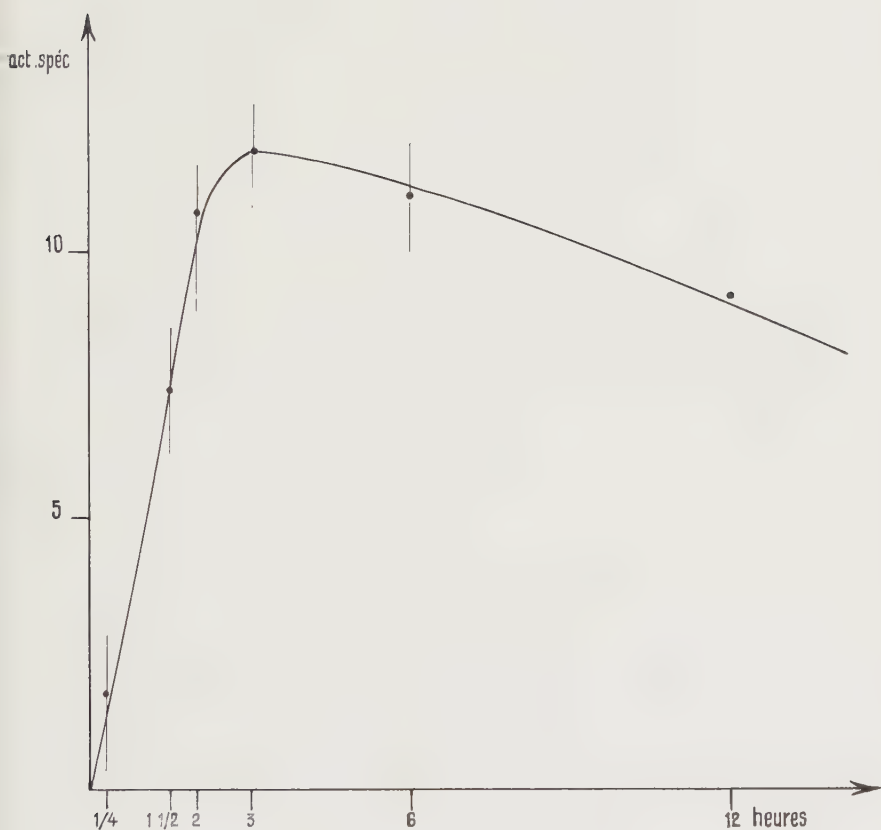


FIG. 6

Evolution de l'activité spécifique du cholestérol libre du foie entier.

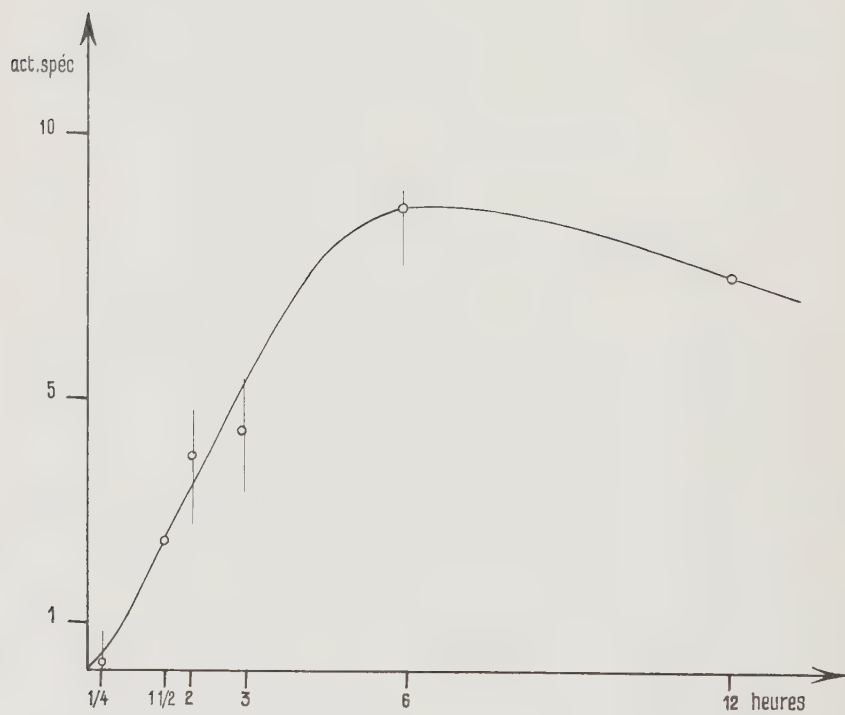


FIG. 7

Evolution de l'activité spécifique du cholestérol estérifié hépatique.

2° Etude du renouvellement du cholestérol libre et du cholestérol estérifié au niveau des structures cellulaires hépatiques.

Il est intéressant de déterminer les échanges entre les membranes microsomiales dont on connaît le pouvoir synthétisant et les autres structures ou fractions cellulaires.

Les proportions respectives du cholestérol libre et estérifié retrouvées dans chacune de ces fractions sont indiquées dans le tableau VII.

D'autre part, les valeurs des activités spécifiques se rapportant au cholestérol libre et au cholestérol estérifié sont groupées dans le tableau VIII ; les courbes des figures 9 et 10 représentent la cinétique d'incorporation du précurseur dans chacune de ces fractions.

CHOLESTÉROL LIBRE.

Aux temps très courts après l'injection d'acétate, les activités spécifiques les plus fortes se trouvent dans les structures, non dans le cytoplasme. Nous observons au temps $1/4$ h, un ordre croissant d'activité allant des microsomes aux mitochondries et aux noyaux (figures 8 et 9) ; il est donc vraisemblable que le cholestérol n'est pas uniquement synthétisé par les membranes microsomiales, mais aussi par les mitochondries et le noyau. A ce même temps $1/4$ h, l'activité spécifique du cytoplasme est inférieure de 30 % à celle des microsomes. Etant donné les faibles quantités de cholestérol présentes dans les noyaux et les mitochondries, on peut dire, malgré les activités élevées observées dans ces structures, que les $4/5$ de l'activité globale des structures hépatiques se trouvent localisés sur les microsomes. (Précisons à nouveau que nos structures, mitochondries et noyaux, purifiées selon la technique de CHAUVEAU [54] sont exemptes de microsomes).

Le marquage du cholestérol cytoplasmique provient du cholestérol des structures synthétisantes, principalement des microsomes, puisque, rappelons-le, le cytoplasme ne participe pas aux étapes finales de la synthèse. Les courbes s'équilibrent vers la deuxième heure. C'est donc une quantité de cholestérol au moins égale à la quantité présente dans le cytoplasme qui

est renouvelée pendant ce même temps dans les structures par passage dans le cytoplasme.

L'étude de la courbe d'évolution de l'activité spécifique du cholestérol microsomial nous permet d'observer des échanges entre le cholestérol nouvellement synthétisé dans les microsomes et le cholestérol de « transport », un retour aux microsomes du cholestérol précédemment synthétisé.

Nous savons, d'après l'activité spécifique du CO_2 expiré, qu'après trois heures l'activité spécifique du précurseur acétate dans l'organisme est très faible. Le degré élevé d'activité spécifique auquel se maintient le cholestérol microsomial entre trois et douze heures (fig. 9) ne peut donc être attribué à la synthèse du cholestérol à partir d'un précurseur actif. Cette décroissance lente de l'activité ne peut davantage représenter un renouvellement lent. Plusieurs arguments tendent à prouver que le renouvellement du cholestérol microsomial est actif. En effet, la partie ascendante de la courbe est abrupte, le maximum d'activité est pratiquement atteint dès la deuxième heure ; de plus, nous savons qu'une quantité égale au cholestérol présent dans le cytoplasme (supérieure en valeur absolue à la quantité de cholestérol microsomial) est renouvelée par passage dans la phase cytoplasmique durant ce même temps. On peut donc par cette seule forme de transport expliquer un renouvellement d'une masse supérieure à celle du cholestérol microsomial ; le renouvellement serait supérieur à 100 % en deux heures.

Dans le cas idéal d'élimination des produits de synthèse, ici représentée par le transfert du cholestérol nouvellement synthétisé dans le cytoplasme, la pente relative au cholestérol microsomial devrait être beaucoup plus forte que la pente de la courbe expérimentale, la décroissance d'activité plus rapide. L'allure lente de la décroissance d'activité dans les microsomes représente donc un apport de cholestérol marqué extra-microsomial.

Au fur et à mesure que le cholestérol quitte les membranes microsomiales, il est échangé par une quantité identique de cholestérol marqué à peu près aussi intensément. Cette fraction de cholestérol que pour l'instant nous ne pouvons définir ne peut provenir que d'un échange avec le plasma.

Une investigation de plus longue durée permettrait, en observant les décroissances d'activité simultanément dans les microsomes, le cytoplasme et le plasma, de savoir si les échanges plasma-microsomes se font principalement par la voie du cytoplasme, ou, si la décroissance d'activité du cholestérol cytoplasmique était plus rapide que celle du cholestérol microsomial, directement par les chenaux microsomaux.

CHOLESTÉROL ESTÉRIFIÉ.

Si l'on examine séparément le cholestérol estérifié de chacune des fractions cellulaires (fig. 10), on observe que l'évolution de son activité est fonction du niveau d'activité du cholestérol libre dans chacune de ces fractions. Nous sommes donc conduit à penser que dans les différentes structures l'estérification du cholestérol libre se ferait localement pour une part importante.

Le cytoplasme contient environ 50 % des esters du cholestérol hépatiques, les microsomes seulement 10 %.

Le cholestérol estérifié du cytoplasme ne peut donc trouver son origine dans le cholestérol estérifié des microsomes, bien que l'activité spécifique de ce dernier soit plus élevée.

Quant aux esters du cholestérol présents dans les mitochondries en faible quantité, il est aussi très vraisemblable qu'ils sont estérifiés *in situ*. La présence de cholestérol estérase dans les mitochondries a par ailleurs été suggérée par des expériences *in vitro* [45].

TABLEAU VII

Répartition du cholestérol libre et estérifié
dans les diverses structures cellulaires hépatiques
(mg/g de foie frais)

	Cholestérol libre	Cholestérol estérifié
Foie entier	2,6	0,3
Microsomes	0,8	0,03
Mitochondries . . .	0,13	tr.
Cytoplasme	1,1	0,15
Graisses libres . . .	0,5	0,1

TABLEAU VIII

**Activité spécifique
du cholestérol libre et du cholestérol estérifié
dans les diverses fractions cellulaires du foie**

act. spéc. = imp./mn par μ mole
rapportée à l'activité injectée p. 100 g de rat

act. spéc. des diverses fractions cellulaires	temps d'incorporation (en heures)	act. spéc. du cholestérol libre	act. spéc. du cholestérol estérifié
Microsomes ...	1/4 h	3	0,7
	2	11,7	7,5
	6	11,6	9
	12 _a	10,9	9,2
Mitochondries .	1/4 h	3,9	
	2	11,1	
	6	11,6	
	12	—	
Noyaux	1/4 h	4,2	
	2	11,6	
	6	11,0	
	12	—	
Cytoplasme	1/4 h	1,9	0,2
	2	11,5	4,9
	6	11,7	8,2
	12	9,8	7,2
Graisses libres..	1/4 h	0,9	0,0
	2	5,4	3,5
	6	7,9	7
	12	9	7,5

a : ensemble des structures (microsomes, mitochondries et noyaux).

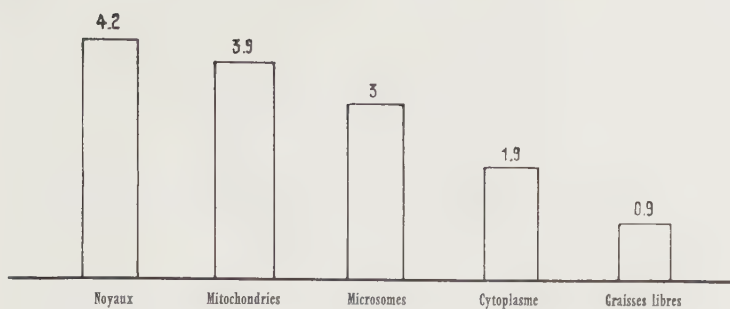


FIG. 8

Activité spécifique du cholestérol libre des fractions cellulaires du foie un quart d'heure après injection d'acétate 1-¹⁴C.

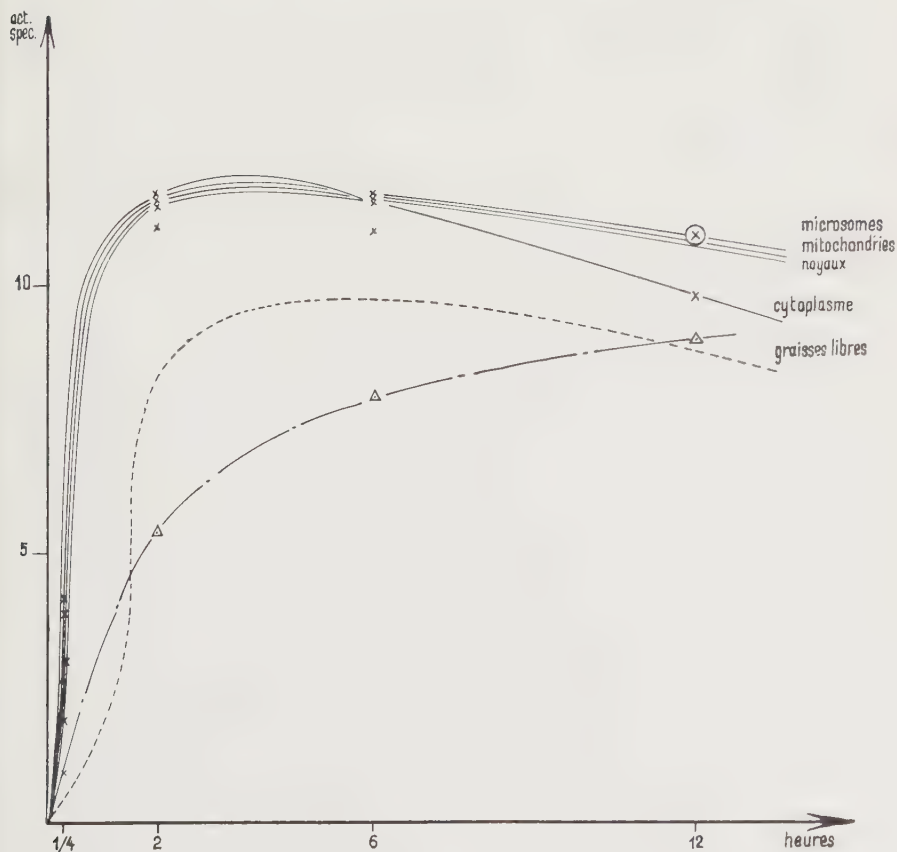


FIG. 9

Evolution de l'activité spécifique du cholestérol libre des fractions cellulaires du foie (en - - - - cholestérol libre plasmatique).

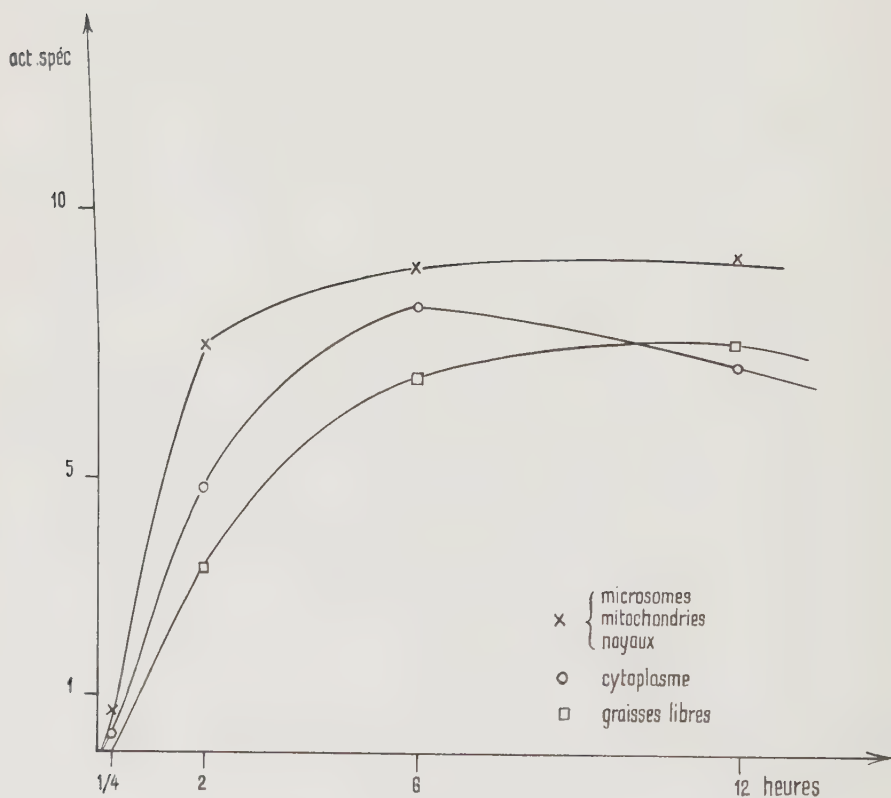


FIG. 10
Evolution de l'activité spécifique du cholestérol estérifié
des différentes fractions cellulaires hépatiques.

CHAPITRE II

**Relations entre le cholestérol plasmatique
et le cholestérol hépatique**

L'évolution d'activité spécifique du cholestérol libre et du cholestérol estérifié plasmatique est représentée par les deux courbes de la figure 11 ; les valeurs correspondantes sont groupées dans le tableau IX.

Dans l'une et l'autre fraction l'incorporation se fait lentement, elle ne commence à être significative qu'au bout d'une heure. Mais tandis que l'activité du cholestérol libre croît ensuite d'une façon abrupte pour atteindre un maximum après trois heures, l'activité des esters du cholestérol progresse très lentement, puis semble vers la douzième heure atteindre un palier qui se prolonge dans le temps.

Nous constatons (fig. 9 et 11), que seul le cholestérol libre plasmatique est en échange rapide avec le cholestérol libre du foie.

Etant donné la similitude d'évolution des activités spécifiques des noyaux, des mitochondries et des microsomes, de même que de celle du cytoplasme jusqu'au temps six heures, nous avons groupé dans la courbe « structures » l'évolution des activités moyennes de ces trois structures et du cytoplasme (structure dispersée) et avons par contre, distingué la courbe d'évolution des graisses libres.

Ainsi nous pouvons mettre en évidence que le cholestérol libre des graisses libres, n'est pas directement à l'origine du cholestérol libre du plasma.

1° Interprétation des échanges entre le cholestérol libre du plasma et le cholestérol libre d'origine hépatique et extra-hépatique.

L'allure sigmoïde de la partie ascendante de la courbe figure un phénomène de dilution. S'il y avait échange de molécules sans apport extra-hépatique dans le plasma, l'activité croîtrait d'une façon plus régulière. Nous pouvons calculer, en appliquant une relation simple de ZILVERSMIT que 80 %

environ du cholestérol libre plasmatique proviennent du foie. Ce pourcentage est égal au rapport : activité spécifique maximale du cholestérol libre du plasma sur activité spécifique du cholestérol libre des structures au temps correspondant.

Il s'ensuit qu'au maximum 20 % du cholestérol libre du plasma proviennent d'autres sources : hydrolyse d'esters du cholestérol plasmatiques et cholestérol libre de tissus divers (peau, poumon, surrénales, etc.), où l'activité synthétisante est plus faible que dans le foie (tableau X).

Les activités élevées que nous avons observées pour le cholestérol de la muqueuse intestinale un quart d'heure après l'injection d'acétate ne retentiraient pas sur le marquage du cholestérol plasmatique. Nous vérifions ainsi les observations de HARPER [33] et de FRIEDMAN et BAYER [36], déjà citées. Ces auteurs n'observent pas après hépatectomie un marquage du cholestérol libre et estérifié alors que le tractus intestinal demeure intact.

La cinétique d'incorporation dans le poumon (fig. 12) montre que la synthèse du cholestérol dans ce tissu est plus lente que dans le foie. Bien que la concentration en cholestérol y soit très élevée, 6 mg par g de tissu frais, la fraction de cholestérol pulmonaire en échange avec le plasma ne peut non plus marquer d'une façon sensible le cholestérol plasmatique.

Nous ne connaissons pas la cinétique de l'incorporation du cholestérol dans les surrénales, mais l'activité spécifique au temps 3 h, temps du maximum d'activité dans le plasma et le foie, et au temps 12 h, nous permet de constater que, relativement à d'autres tissus, l'activité synthétisante y est faible. La synthèse du cholestérol par des coupes de cet organe a été mise en évidence par divers auteurs [61, 62] ; la faible activité que nous y trouvons n'est pas uniquement due à un transfert à partir du plasma, mais, inversement, le marquage du cholestérol des surrénales ne saurait accroître celui du cholestérol plasmatique.

CHEVALLIER [18], et plus récemment AVIGAN et STEINBERG [63], ont étudié les échanges entre le cholestérol de divers tissus et le cholestérol plasmatique à des temps longs après ingestion de cholestérol 4-¹⁴C. Les valeurs relatives

sont obtenues en rapportant la variation de l'activité spécifique du cholestérol dans ces divers tissus à la décroissance d'activité du cholestérol dans le sérum. Il en ressort que l'équilibre entre le cholestérol hépatique et plasmatique se maintient constamment jusqu'à la chute de l'activité spécifique du cholestérol dans ces deux tissus, tandis que le rapport entre l'activité spécifique du cholestérol dans les tissus extra-hépatiques et celle du cholestérol plasmatique croît au cours du temps, montrant que les échanges sont peu importants.

2° Détermination du renouvellement du cholestérol libre plasmatique d'origine hépatique.

Normalement les teneurs en cholestérol libre et en cholestérol estérifié du foie et du plasma sont constantes pour une espèce animale donnée, ceci pour des durées de jeûne bien définies ainsi qu'exposé plus haut.

L'état stationnaire étant vérifié dans les conditions de nos expériences, il nous est possible de considérer les échanges entre le cholestérol libre du foie (F) et celui du plasma (P) suivant le schéma :



F étant le précurseur immédiat de P , X représentant l'apport du cholestérol extra-hépatique au plasma.

Nos résultats expérimentaux ont permis trois conclusions :

1) L'apport de radioactivité de $X \rightarrow P$ est négligeable par rapport à celui de $F \rightarrow P$.

L'activité spécifique du cholestérol hépatique en échange avec le cholestérol libre du plasma à un temps donné correspond à celle du cholestérol des « structures cellulaires » (cholestérol du foie entier moins celui des graisses libres surnageantes).

3) Exprimés en quantités de cholestérol, 80 % de P proviennent de F et 20 % de X .

Graphiquement nous sommes donc amené à construire (fig. 13), les courbes d'évolution de l'activité spécifique du cholestérol des « structures cellulaires » et de l'activité spéci-

fique des 80 % du cholestérol plasmatique en échange avec ce compartiment.

Nous appliquerons le calcul graphique déduit de la relation de ZILVERSMIT entre les activités spécifiques du précurseur s_a et du produit s :

$$\frac{ds}{dt} = k (s_a - s)$$

où k représente la fraction du produit (cholestérol libre plasmatique) renouvelée par unité de temps.

S désignant la surface délimitée par les deux courbes et deux bornes t_1 et t_2 on a, intégrant s entre ces bornes :

$$s_{t_2} - s_{t_1} = kS$$

$$\text{d'où } k = \frac{S}{s_{t_2} - s_{t_1}}$$

Les courbes expérimentales se recouvrent à partir de la sixième heure, les activités spécifiques du produit et du précurseur étant alors pratiquement égales. Nous choisissons les bornes de temps :

$$t_1 = 1 \text{ h}$$

$$t_2 = 3 \text{ h}$$

On en tire la valeur de k :

$$k = 1,03$$

k représente la fraction du cholestérol libre du plasma renouvelée par heure par échange avec le foie. Mais seuls les 80 % de P sont en jeu, soit pour un rat de 300 g : 0,96 mg environ de cholestérol.

La quantité de cholestérol libre plasmatique provenant du foie et renouvelée par heure est donc voisine de 1 mg.

3° Interprétation du renouvellement du cholestérol estérifié.

L'activité spécifique du cholestérol estérifié est généralement inférieure à celle du cholestérol libre du même compartiment tissulaire, structures du foie, poumon, muqueuse intestinale et plasma.

Cependant, dans le plasma nous observons une particularité : les courbes relatives au cholestérol libre et au cholestérol estérifié se coupent, en phase de décroissance d'activité du cholestérol libre, sensiblement au-dessous du maximum d'activité spécifique du cholestérol estérifié (fig. 11). Nous mettons en évidence que le cholestérol libre du plasma est l'un des précurseurs du cholestérol des esters plasmatiques, il y aurait donc échanges de molécules entre les deux formes de cholestérol *in situ*, dans les diverses lipoprotéines sériques.

PORTER et HAVEL [64] ont observé chez le chien, après injection intraveineuse de lipoprotéines sériques marquées au cholestérol libre 4-¹⁴C, l'apparition d'un marquage des esters du cholestérol plasmatiques, marquage qui demeure toujours inférieur à celui du cholestérol libre, jusqu'à disparition de la radioactivité dans cette dernière fraction. Le renouvellement du cholestérol estérifié est extrêmement lent comparé au renouvellement du cholestérol libre ; les échanges entre les deux formes de cholestérol des diverses lipoprotéines se font donc très lentement. Nous ne pouvons pas calculer les quantités en échanges, car il est vraisemblable que le cholestérol libre plasmatique n'est pas le seul précurseur des esters.

La recherche de ces autres précurseurs dans le foie nous conduit à examiner plus particulièrement (relations entre figures 10 et 11) les membranes microsomiales qui seraient susceptibles de fournir, pour la synthèse des esters de cholestérol des lipoprotéines plasmatiques, du cholestérol marqué, plus actif que le cholestérol libre plasmatique. L'on sait que les globulines (à l'exception des γ globulines) et les albumines sériques sont synthétisées par le foie. Si les recherches de PETERS [65], de CAMPBELL [66] et de OGATA [67], montrent que ces protéines sériques sont synthétisées par la fraction ribosomiale des microsomes, aucune preuve expérimentale ne permet d'avancer que les lipoglobulines sériques préexistent au niveau des microsomes. Nous avons établi en ce qui concerne les esters de cholestérol des microsomes, qu'ils sont fortement actifs mais ils s'y trouvent en de très faibles quantités. Il est donc peu vraisemblable qu'ils rentrent dans la constitution des esters de cholestérol des lipoprotéines plasmatiques, et l'on peut dire que, pour une part importante, l'estérification du cholestérol se ferait *in situ* dans le plasma.

TABLEAU IX

**Activité spécifique du cholestérol libre
et du cholestérol estérifié plasmatiques**

temps d'incorporation (en heures)	act. spéc. du cholestérol libre	act. spéc. du cholestérol estérifié
1/4 h	0,6 $\pm$ 0,6	0,0
1 h 1/2	1,94 $\pm$ 0,07	
2 h	7 $\pm$ 0,5	2,82
3 h	8,9 $\pm$ 0,5	
6 h	9,3 $\pm$ 0,4	6,3
12 h	8,8	7,3

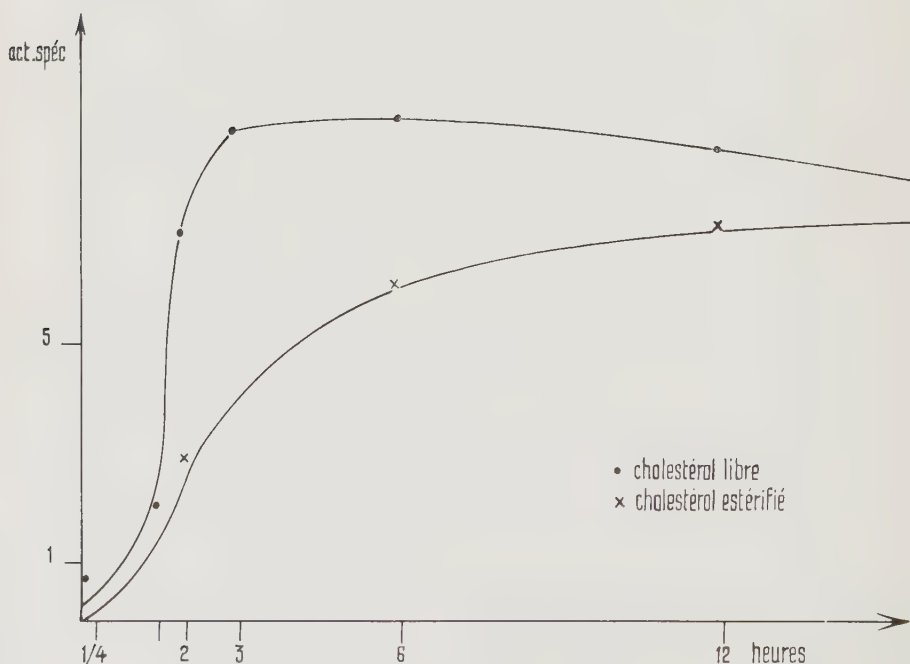


FIG. 11

Evolution de l'activité spécifique du cholestérol libre
et du cholestérol estérifié plasmatiques.

TABLEAU X

Activités spécifiques du cholestérol de différents tissus,
un quart d'heure après l'injection d'acétate ^{14}C

	imp./mn/mg
Muqueuse intestinale	3 040
Foie	762
Plasma	129
Poumon	66
Surrénales	18
Peau	0

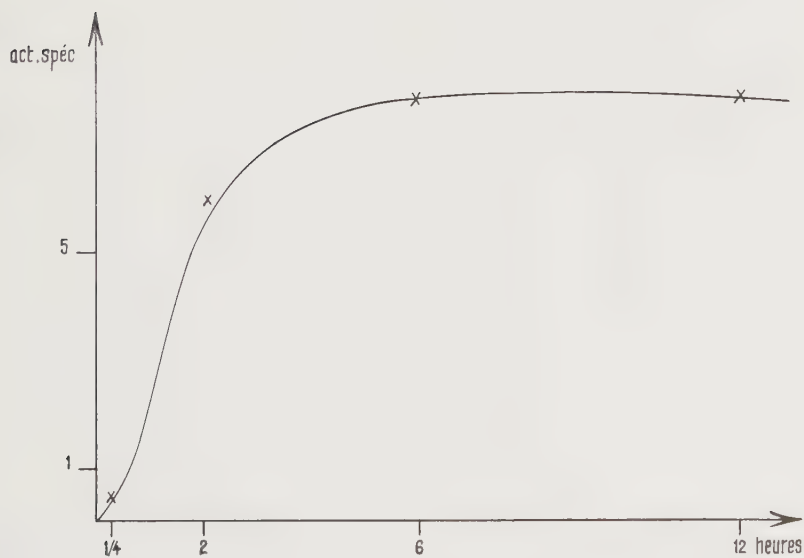


FIG. 12

Evolution de l'activité spécifique du cholestérol libre du poumon.

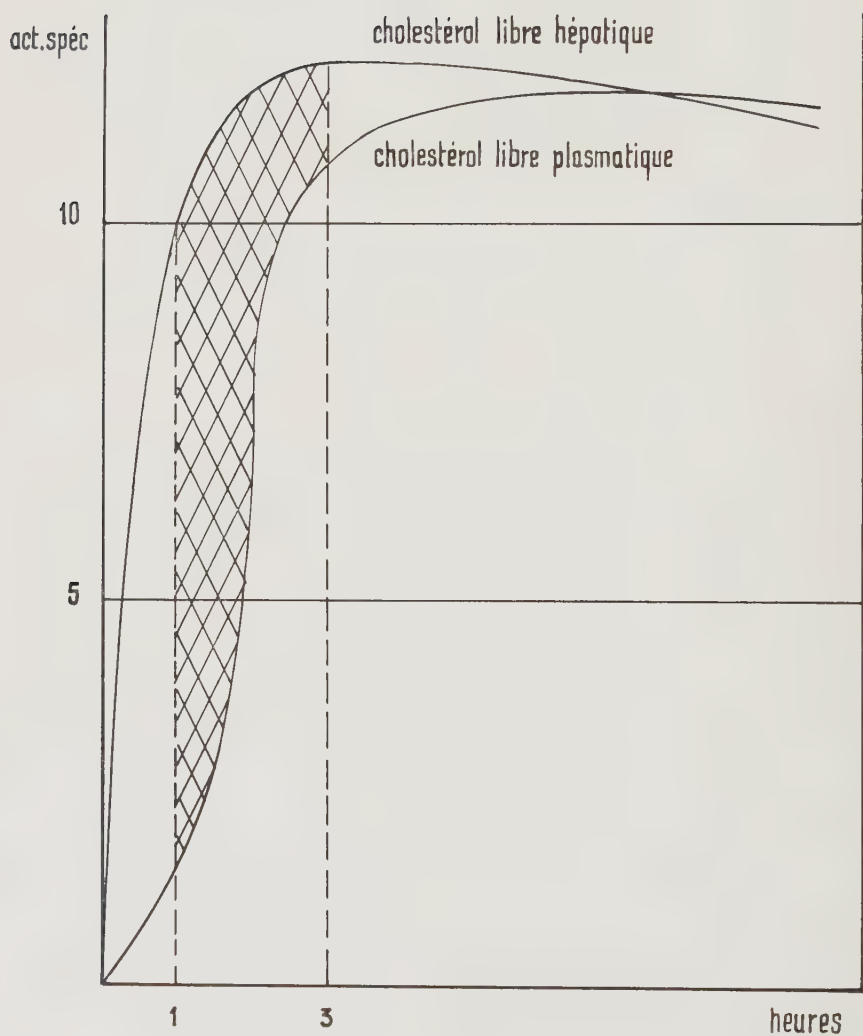


FIG. 13

Détermination des échanges de cholestérol libre entre le foie et le plasma.

TROISIÈME PARTIE

NATURE ET RENOUVELLEMENT DES ACIDES GRAS DES ESTERS DU CHOLESTÉROL

De même que le problème de l'origine du cholestérol estérifié nous a conduit à étudier son précurseur le cholestérol libre, pour essayer de définir la part revenant au transport ou à l'estérification *in situ*, de même, nous rechercherons l'origine des acides gras précurseurs des esters du cholestérol dans les acides gras non estérifiés, ainsi que dans les acides gras des triglycérides de divers tissus. Nous tiendrons compte, chaque fois que les discussions l'exigeront, des résultats obtenus par certains auteurs pour les phospholipides.

Par l'analyse des acides gras on entend rechercher s'il existe une spécificité, due à la nature de l'alcool estérifié, cholestérol ou glycérol, dans l'affinité pour les acides gras, et si cette spécificité joue de la même façon dans les divers tissus.

En comparant les vitesses avec lesquelles l'incorporation des acides gras se fait dans les esters de cholestérol et les autres lipides, on espère pouvoir établir entre eux des relations de précurseur à dérivé ou au contraire démontrer une certaine indépendance, indépendance qui demeurerait cependant très relative car l'on sait que l'injection ou l'ingestion d'un acide gras amène par échanges sa répartition dans les divers lipides de l'organisme.

CHAPITRE I

Nature des acides gras des esters du cholestérol

1° Composition en acides gras.

Nous donnons dans le tableau XI, les teneurs relatives en esters du cholestérol, triglycérides et acides gras non estérifiés

des extraits lipidiques plasmatiques et tissulaires. Dans les tableaux suivants XII, XIII, XIV, nous indiquons leur composition en acides gras.

Le tableau XV (emprunté à M. PASCAUD) indique, à titre de comparaison, la composition en acides gras des phospholipides du foie, des surrénales et du plasma.

Rappelons que nous avons obtenu ces pourcentages d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse d'esters méthyliques obtenus par transméthylation directe des esters du cholestérol et non par méthylation des acides gras. La saponification par de la potasse alcoolique 2 N, suivie d'une extraction à l'éther de pétrole du cholestérol libéré, nous a conduit à des résultats par défaut pour les acides oléique et arachidonique. Rappelons encore, ainsi que nous l'avons déjà développé dans la partie technique, la nécessité d'effectuer chaque analyse sur deux phases stationnaires différentes, afin de déterminer les pics contaminants.

ESTERS DU CHOLESTÉROL.

Nous observons une variabilité de la composition en acides gras des esters du cholestérol selon qu'il s'agit d'extraits plasmatiques ou tissulaires.

Les esters du cholestérol du plasma diffèrent de ceux des tissus, à l'exception de ceux des surrénales, par leur richesse en acides polyéniques : 48 % contre 12 % environ dans le foie, et 33 % dans les surrénales.

Un fait cependant les caractérise toujours, c'est le faible pourcentage en acides gras saturés, environ 20 % dont 13 à 15 d'acide palmitique et 3 à 9 d'acide stéarique. Les acides gras insaturés atteignent au total 80 % ; la répartition des acides gras insaturés en monoènes et polyènes nous donne pour le plasma, 35 % environ de monoènes (30 d'acide oléique, 6 d'acide palmitoléique) et 48 % de polyènes (16 d'acide linoléique, 27 d'acide arachidonique). Pour le foie, 63 % de monoènes dont 60 % d'acide oléique et 12 % seulement de polyènes. Cette composition moyenne que nous observons pour les esters du cholestérol extraits du foie entier, se retrouve d'ailleurs au niveau des différentes structures cellulaires hépatiques, ainsi que dans les graisses libres surnageantes (tableau XVI).

TRIGLYCÉRIDES.

L'uniformité de composition en acides gras des triglycérides est remarquable si on la compare à la variabilité de composition que nous venons de décrire pour les esters de cholestérol. Cette composition des triglycérides se traduit par un schéma unique que nous retrouvons dans tous les tissus : foie, muqueuse intestinale, peau, poumon, tissu adipeux et dans le plasma (tableau XIII). Environ 30 % d'acides gras saturés dont 25 d'acide palmitique et 70 % d'acides gras insaturés avec une proportion constante de 50 à 60 % d'acide oléique, de 6 à 8 % d'acide linoléique, et suivant le tissu étudié, de 3 à 7 % de polyinsaturés supérieurs en 22 C à 5 et 6 liaisons éthyléniques ; le fait que nous ayons trouvé dans le poumon 8 % d'acide lignocérique à 24 C est à signaler comme une particularité.

Qu'il s'agisse d'esters de cholestérol ou de triglycérides, on ne trouve qu'une faible proportion d'acide stéarique, alors que dans les phospholipides la teneur en cet acide gras saturé est plus élevée que celle du palmitique.

ACIDES GRAS NON ESTÉRIFIÉS.

Quant aux acides gras non estérifiés (tableau XIV), ils diffèrent de ceux des deux formes d'esters que nous venons d'étudier par leur forte teneur en acides gras saturés, acide palmitique et acide stéarique, et en acides gras à chaînes courtes.

En résumé, la composition en acides gras des esters du cholestérol tissulaires se rapproche du type de celle des acides gras des triglycérides, teneur extrêmement élevée en acide oléique et faible en polyènes. Les esters de cholestérol plasmatiques au contraire, ont une composition spécifique, forte teneur en polyènes, supérieure même à celle en monoènes, ce qui souligne leur indépendance vis-à-vis des esters synthétisés dans certains tissus. Ceci va nous permettre de discuter sur l'origine des esters de cholestérol plasmatiques.

2° Discussion sur l'origine des esters de cholestérol plasmatiques.

Par le seul fait que l'arachidonate de cholestérol ne se

trouve dans le foie qu'en infime quantité, on peut admettre qu'au moins cette fraction des esters plasmatiques, représentant 27 % des esters de cholestérol totaux du plasma, ne trouve pas son origine dans le foie.

Il est utile d'ouvrir ici une parenthèse en ce qui concerne la comparaison entre nos résultats sur le rat et certains résultats que nous avons obtenus sur d'autres espèces : porc, lapin et homme. Dans tous les cas, la teneur en polyènes des acides gras totaux des esters du cholestérol est élevée, mais un pourcentage élevé d'acide arachidonique ne s'observe que chez le rat.

En ce qui concerne le linoléate de cholestérol plasmatique il en va de même, il ne peut sans doute résulter d'un simple transfert du foie, où il représente 7 % des esters du cholestérol, au plasma où sa teneur est de 16 %. Chez les différentes espèces animales, le rapport diènes esters plasmatiques

diènes esters hépatiques est encore plus faible que chez le rat. Les esters de cholestérol plasmatiques d'un sujet humain normal contiennent de 47 à 50 % d'acide linoléique ; ce pourcentage élevé et peu variable est également indiqué par SCHRADE [68].

La mise en évidence d'acides polyinsaturés dans les esters de cholestérol des surrénales pose le problème de leurs relations avec les esters de cholestérol plasmatiques. Le « pool » des esters de cholestérol dans les surrénales est quantitativement l'équivalent de celui des esters de cholestérol plasmatiques ; étant donné la composition de ces esters en acides gras, on constate que la quantité d'arachidonate de cholestérol des surrénales est moitié de celle du plasma.

Nos données concernant l'évolution de l'activité spécifique dans les acides gras et le cholestérol des surrénales sont fragmentaires. Nous retiendrons les mesures effectuées à la troisième heure pour le cholestérol estérifié, ainsi que pour le cholestérol libre des surrénales.

	Plasma	Surrénales
Cholestérol libre	11,25	3,4
Cholestérol estérifié	4,8	1,47

A moins d'échanges préférentiels de certaines fractions, dans leur ensemble les esters de cholestérol plasmatiques dérivent peu des esters de cholestérol des surrénales.

TABLEAU XI

Teneurs relatives en esters de cholestérol, triglycérides
et acides gras non estérifiés du plasma
et de divers tissus du rat

(exprimées en μ moles d'acides gras)

	Acides gras des esters du cholestérol	Acides gras des triglycérides	Acides gras non estérifiés
Plasma /cm ³	0,8	2,5	1,05
Foie /g pds frais	1	45	2,12
Poumon /g pds frais	2,25	26	2,2
Muqueuse intestinale /g pds frais	0,1	2,2	1,1
Surrénales /100 mg pds frais	5	28,5	

TABLEAU XII

Composition en acides gras des esters du cholestérol
(en % des acides totaux)

		Foie	Surrénales	Plasma
A.G. saturés	14 C	0,6	0,8	0,7
	16 C	13,2	16,5	13
	18 C	7,1	6,4	2
	16 C 1 Δ	3	4,05	4,5
	18 C 1 Δ	59,8	35	30
A.G. insaturés	18 C 2 Δ	6,8	3	16
	20 C 3	1,2	3,7	2
	20 C 4 Δ	0,8	14,8	27
	22 C 5 Δ	3,5	12	2,1
	22 C 6 Δ			1,2

TABLEAU XIII
Composition en acides gras des triglycérides
(en % des acides totaux)

		Foie	Surrénales	Plasma
A.G. saturés	14 C	0,5	0,8	0,8
	16 C	26,4	23	26
	18 C	4,1	2,6	5
	Monoènes			
	16 C 1 Δ	2,9	2,5	3
	18 C 1 Δ	57,2	57	52
A.G. insaturés	Polyènes			
	18 C 2 Δ	7,5	6	8
	20 C 3 Δ	0,8	0,9	3
	20 C 4 Δ	2,7	5,3	2,1
	22 C 5 Δ			
	22 C 6 Δ			

TABLEAU XIV
Nature des acides gras non estérifiés du foie et du plasma
(en % des acides totaux)

		Foie	Plasma
A.G. saturés	14 C	6,3	2,5
	16 C	49,7	28,2
	18 C	20,2	12,3
	Monoènes		
	16 C 1 Δ	2,6	6,1
	18 C 1 Δ	13,1	42
A.G. insaturés	Polyènes		
	18 C 2 Δ	1,6	6,3
	20 C 3 Δ	0,7	0,8
	20 C 4 Δ	1,2	1,3
	22 C 5 Δ		
	22 C 6 Δ		

TABLEAU XV

Composition en acides gras des phospholipides chez le rat
Foie - Surrénales - Plasma

(d'après M. PASCAUD)

% d'A.G.	Foie	Surrénales	Plasma
Myristique		tr	0,3
Palmitique	19,1	12,5	19,1
Palmitoléique	1,9	0,3	0,4
Stéarique	32,7	50	38,4
Oléique	10,3	13,2	6,6
Linoléique	4,1	1,8	3,8
Eicosatriénoïque	1,6	tr	0,8
Arachidonique	22,5	20,5	12,4
20 C 5 Δ	tr	—	0,6
22 C 5 Δ	tr	—	2,6
22 C 6 Δ	6,4	—	3,5

TABLEAU XVI

Esters de cholestérol du tissu hépatique global
et des structures cellulaires hépatiques

% d'A.G.	Tissu hépatique	Microsomes	Cytoplasme	Graisses libres
Myristique ...	0,6	0,45	0,8	0,8
Palmitique	13,2	15,65	17,4	17,1
Palmitoléique .	3	4,6	6	4,3
Stéarique	7,1	9,9	6,5	6,5
Oléique	59,8	59,3	60,4	61
Linoléique	6,8	4	3,2	3,5
Eicosatriénoïque				
Arachidonique				
20 C 5 Δ	5,5	5	4,8	7,10
22 C 5 Δ				
22 C 6 Δ				

CHAPITRE II

**Renouvellement des acides gras
des esters du cholestérol**

Nous examinerons le renouvellement des acides gras uniquement dans le foie et dans le plasma, notre étude du renouvellement du cholestérol ayant porté sur ces deux tissus.

L'incorporation de l'acétate $1\text{-}^{14}\text{C}$ dans les acides gras des lipides hépatiques nous fournit une double indication, d'une part sur la synthèse à partir du précurseur, et de l'autre sur l'estérification de ces acides gras nouvellement synthétisés. Dans le plasma il n'y a pas de synthèse, l'incorporation d'acides gras radioactifs dans les acides gras estérifiés représente alors, ou bien une transestérification *in situ* par échanges d'acides gras entre les constituants lipidiques, ou bien un transport de molécules entières.

**1. — Etude de l'incorporation d'acétate $1\text{-}^{14}\text{C}$
dans les acides gras du foie**

La recherche des vitesses d'estérification nous conduit à l'étude comparée du renouvellement des divers lipides et à préciser ensuite le rôle particulier de certains acides gras dans ce renouvellement.

ACIDES GRAS DES ESTERS DU CHOLESTÉROL.

L'incorporation de radioactivité est lente dans les acides gras des esters du cholestérol du *tissu hépatique* (fig. 14). Elle croît lentement pour atteindre un maximum vers deux heures. Puis, l'activité du précurseur étant devenue négligeable, il s'ensuit une décroissance d'activité des acides gras nouvellement synthétisés.

En phase de décroissance d'activité, le test de décroissance exponentielle ne se vérifie pas. Un ordre de grandeur de la demi-vie peut cependant être déterminé pour l'ensemble des acides gras. Graphiquement, $t_{1/2}$ est évalué à 2,8 h ; le temps de renouvellement serait d'environ quatre heures.

Une quantité égale à 25 % environ des acides gras des esters du cholestérol hépatiques est renouvelée par heure, par incorporation de nouveaux acides gras.

Nous avons recherché si l'estérification par ces acides gras est localisée plus particulièrement dans l'une ou l'autre des *structures cellulaires hépatiques*, et avons, dans ce but, comparé l'évolution d'activité spécifique des acides gras des esters du cholestérol des microsomes, du cytoplasme et des graisses libres surnageantes (fig. 15). Nous constatons qu'elle se fait partout approximativement à la même allure. Ceci confirme l'hypothèse que nous avons énoncée précédemment d'une estérification indépendante dans chaque compartiment cellulaire.

ACIDES GRAS NON ESTÉRIFIÉS ET ACIDES GRAS DES TRIGLYCÉRIDES.

Ces acides gras présentent un pic d'activité élevé dès le premier quart d'heure (fig. 14). *L'incorporation de radioactivité* y est rapide par rapport à la croissance lente d'activité observée dans les esters du cholestérol.

Rappelons que, dans le foie, les acides gras non estérifiés ne comptent pas pour plus de 5 % des acides gras des triglycérides et les acides gras des esters du cholestérol seulement pour 2 % de ces derniers. Les courbes représentant l'évolution de l'activité spécifique des acides gras de l'ensemble de ces trois constituants, les non-phospholipides totaux (NPL) et celle des acides gras des triglycérides (90 % des NPL) sont superposables, sauf aux temps très courts après l'injection d'acétate. Etant donné qu'à ces temps courts l'activité spécifique des acides gras des esters du cholestérol est relativement faible, l'écart d'activité observé entre NPL et triglycérides relève des acides gras non estérifiés. Rapidement synthétisés et rapidement renouvelés, leur activité spécifique décroît rapidement et évolue ensuite comme celle des glycérides.

On sait que les acides gras non estérifiés extraits d'un tissu représentent, en partie, les acides biosynthétisés *in situ*. L'examen des acides gras non estérifiés au niveau des ultra-

structures pouvait nous donner des indications utiles sur les sites de synthèse, mais, à la suite des ultracentrifugations, nous avons constaté une hydrolyse des divers esters ; de ce fait, les acides gras biosynthétisés se trouvaient largement contaminés. Contrairement aux acides gras non estérifiés extraits à partir des tissus entiers, les acides gras non estérifiés des structures obtenus après centrifugation ne nous ont jamais semblé être représentatifs des acides gras néoformés.

Tandis que l'estérification du cholestérol, nous l'avons montré précédemment, semble se faire avec la même allure dans chacun des compartiments cellulaires, nous distinguons, pour les triglycérides, deux ordres de vitesses d'incorporation selon qu'il s'agit des structures ou des graisses libres surnageantes (fig. 16).

Dans les structures, l'activité spécifique la plus forte observée pour les triglycérides se trouve dans les microsomes : nous connaissons la teneur faible de ces membranes en glycérides. Dans le cytoplasme, malgré la dilution des acides gras nouvellement synthétisés par une quantité importante d'acides gras non marqués, on observe cependant une activité résultante élevée. Ceci nous permet de préciser que *la phase cytoplasmique incorpore avec une grande vitesse les acides gras qu'elle synthétise dans les glycérides*, ce qui n'est pas le cas de l'incorporation dans les esters du cholestérol.

L'échange des acides gras des triglycérides entre le cytoplasme et les graisses libres est lent. Le maximum d'activité observé à la deuxième heure dans les glycérides des graisses libres, commande et explique le deuxième pic d'activité des glycérides extraits du foie entier (fig. 14).

La décroissance d'activité spécifique mesurée à partir du maximum de deux heures, où les niveaux d'activité des différents triglycérides sont sensiblement les mêmes, et où l'activité du précurseur n'est plus en jeu, est jusqu'à la sixième heure du type exponentiel. De six heures à douze heures, l'activité faible demeure à peu près constante, on atteint un équilibre d'activité (fig. 16). La vitesse de renouvellement calculée pour la phase de décroissance d'activité qui se situe entre deux et six heures, nous permet donc de préciser que *20 % des acides gras estérifiés par le glycérol sont renouvelés par heure*.

Ceci correspond approximativement à l'ordre de grandeur (25 %) déterminé pour le renouvellement des acides gras estérifiés par le cholestérol hépatique.

Toutefois, cette vitesse d'incorporation moyenne, valable pour l'ensemble des acides gras, est-elle représentative du renouvellement de chaque type d'acides gras, ou bien représente-t-elle la résultante de plusieurs composantes ?

Participation des divers ACIDES GRAS SATURÉS et INSATURÉS au renouvellement des esters du cholestérol et des triglycérides hépatiques* :

A partir du précurseur acétate $1\text{-}^{14}\text{C}$, l'incorporation de radioactivité est considérablement plus importante dans l'ensemble des acides gras saturés que dans l'ensemble des acides gras insaturés.

Dans nos expériences (acétate 8 mC/m mole - Saclay), les niveaux d'activités spécifiques très bas trouvés pour l'acide oléique, les acides polyinsaturés supérieurs et même pour l'acide stéarique ne nous ont pas permis de faire une étude complète du renouvellement. En valeur absolue, les activités sont très faibles et difficilement mesurables. Nous ne donnons comme exemple dans le tableau XVIII que les valeurs trouvées dans les microsomes où le niveau d'activité est cependant le plus élevé. De plus, le renouvellement de l'acide linoléique n'est pas accessible par le marquage de l'acétate, cet acide gras n'étant pas synthétisé dans l'organisme animal.

A l'exception de l'acide palmitique, les autres acides gras interviennent donc pour une faible part dans l'évolution des courbes précédemment analysées. Aussi nous discuterons uniquement du *renouvellement de l'acide palmitique*.

* Les essais de KLEIN [69], sur colonne d'acide silicique, de MAHADEVAN et LUNDBERG [70] par chromatographie en couche mince, montrent qu'il demeure difficile de séparer les divers cholestérides pour en étudier individuellement le renouvellement. C'est pourquoi nous avons hydrolysé l'ensemble des esters du cholestérol et fractionné ensuite les divers A.G. marqués en collectant chacun d'eux séparément.

D'après la comparaison entre les courbes de la figure 17 relatives à l'évolution d'activité spécifique de l'acide palmitique et celles de la figure 14 concernant les acides gras totaux, nous constatons en effet que seul l'acide palmitique imprime l'allure d'ensemble de l'incorporation figurée par ces dernières courbes.

Les pics d'activité spécifique maxima observés aux temps un quart d'heure pour l'acide palmitique des glycérides des structures et deux heures pour l'acide palmitique des graisses libres, deux heures aussi pour celui des esters du cholestérol, correspondent aux pics d'activité des acides gras totaux de ces lipides, au niveau d'activité près. L'activité spécifique très inférieure de l'ensemble des acides gras est due à la dilution de l'acide palmitique par les acides gras insaturés peu marqués. Rappelons que le pourcentage d'acide palmitique est constant pour chacun des types de lipides, qu'il s'agisse des microsomes, du cytoplasme ou des graisses libres : 13 % pour les esters du cholestérol, 25 % environ pour les glycérides.

La figure 17 permet de distinguer deux ordres de vitesse d'estérification des glycérides par l'acide palmitique, l'une relative aux structures cellulaires, l'autre relative aux graisses libres, et au contraire révèle une vitesse moyenne unique pour le palmitate de cholestérol dans les divers compartiments cellulaires, confirmant ainsi que l'étude précédente du renouvellement des acides gras dans leur ensemble se ramène à l'étude du renouvellement de l'acide palmitique.

L'acide palmitique nouvellement synthétisé par les enzymes cytoplasmiques s'incorpore et se renouvelle, nous l'avons dit, très rapidement dans les glycérides du cytoplasme et dans les glycérides des microsomes. Au contraire, l'incorporation et le renouvellement sont lents dans les glycérides des graisses libres.

Ces résultats obtenus à la suite de la biosynthèse de l'acide palmitique à partir du précurseur actif acétate, s'accordent avec les observations de STEIN et SHAPIRO [71, 72], faites après injection de palmitate radioactif. Ils peuvent conduire à deux hypothèses : ou les triglycérides cytoplasmiques seraient les précurseurs des triglycérides des graisses libres, hypothèse retenue par SHAPIRO, ou l'acide palmitique s'estérifierait *in situ* dans les graisses libres comme dans les structures, seulement

cette estérification y serait plus lente. Nous pouvons ajouter en faveur de cette seconde hypothèse que l'estérification est certaine pour les esters du cholestérol, et aussi pour les phospholipides des graisses libres (M. PASCAUD) [73], car l'acide palmitique de ces deux lipides est aussi actif ou plus fortement actif que celui de ces mêmes constituants dans le cytoplasme.

Les acides gras non estérifiés des graisses libres, très contaminés par des acides gras hydrolysés lors des ultracentrifugations, ne nous ont pas permis d'avoir une indication précise sur leur rôle dans l'apport de radioactivité. Il est effectivement possible que les acides gras non estérifiés ne pénètrent pas facilement dans la partie interne de ces « micro chylomicrons » que constituent les glycérides des graisses libres.

D'après les données de M. PASCAUD [73] sur l'incorporation de l'acétate dans les acides gras des phospholipides hépatiques, d'après aussi quelques résultats expérimentaux que nous avons obtenus pour les acides stéarique et oléique, nous pouvons penser que, toujours à un niveau d'activité près, en l'occurrence très inférieur à celui de l'acide palmitique, l'évolution d'activité spécifique de ces acides gras suit la même allure que celle de l'acide palmitique.

Il n'en va pas de même pour les acides linoléique et arachidonique, et nous discuterons de cette particularité lors de l'étude du renouvellement des lipides dans le plasma.

TABLEAU XVII

Activité spécifique des acides gras des lipides hépatiques

Temps (en heures)	Non-phospholipides totaux	Glycérides	Cholestérides
1/4	2,59	2,20	0,58
1/2	1,61	1,85	0,96
1	1,74	1,80	1,22
1 1/2	1,27	1,16	1,51
2	1,64	1,55	1,67
3	1,34	1,41	1,09
6	0,73	0,71	0,49

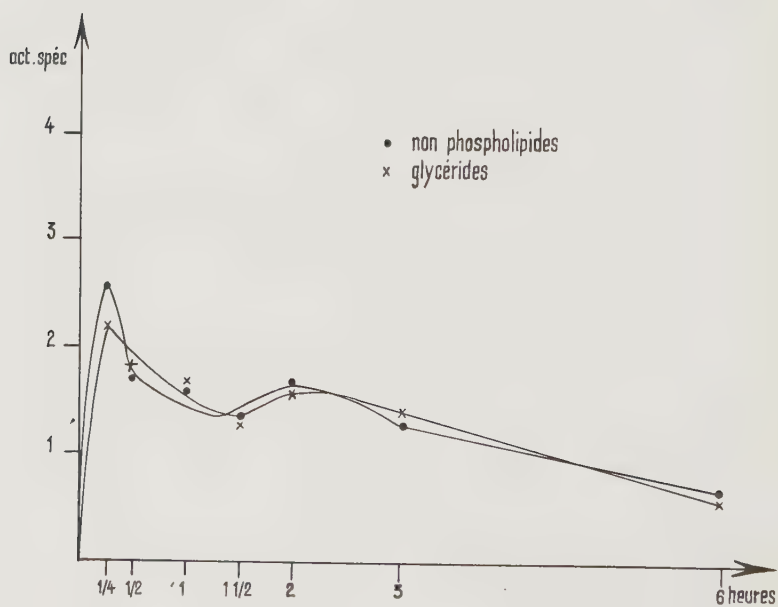
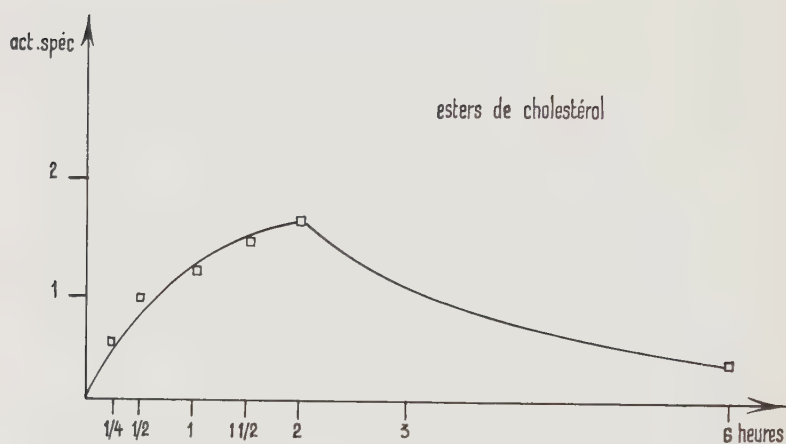


FIG. 14

Incorporation d'activité ^{14}C dans les acides gras du tissu hépatique.

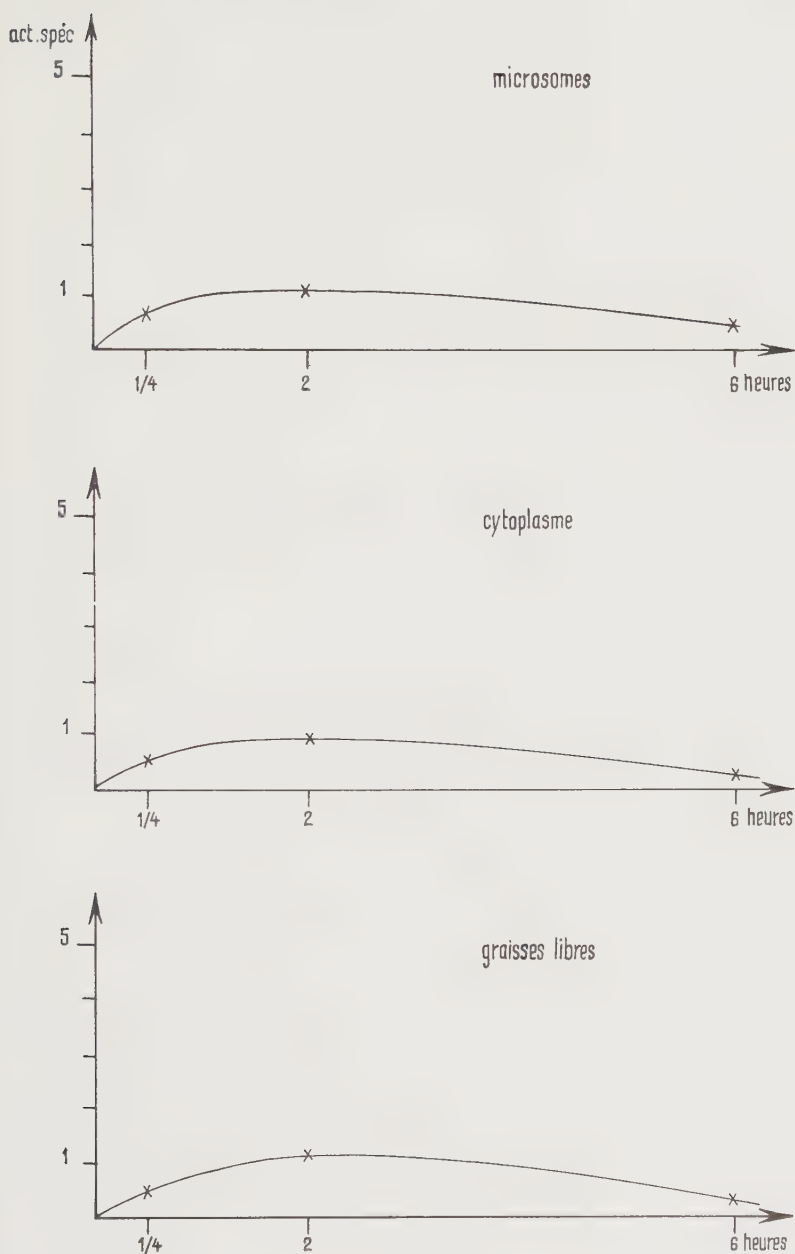


FIG. 15

Incorporation d'activité ^{14}C dans les acides gras des esters du cholestérol des fractions cellulaires hépatiques.

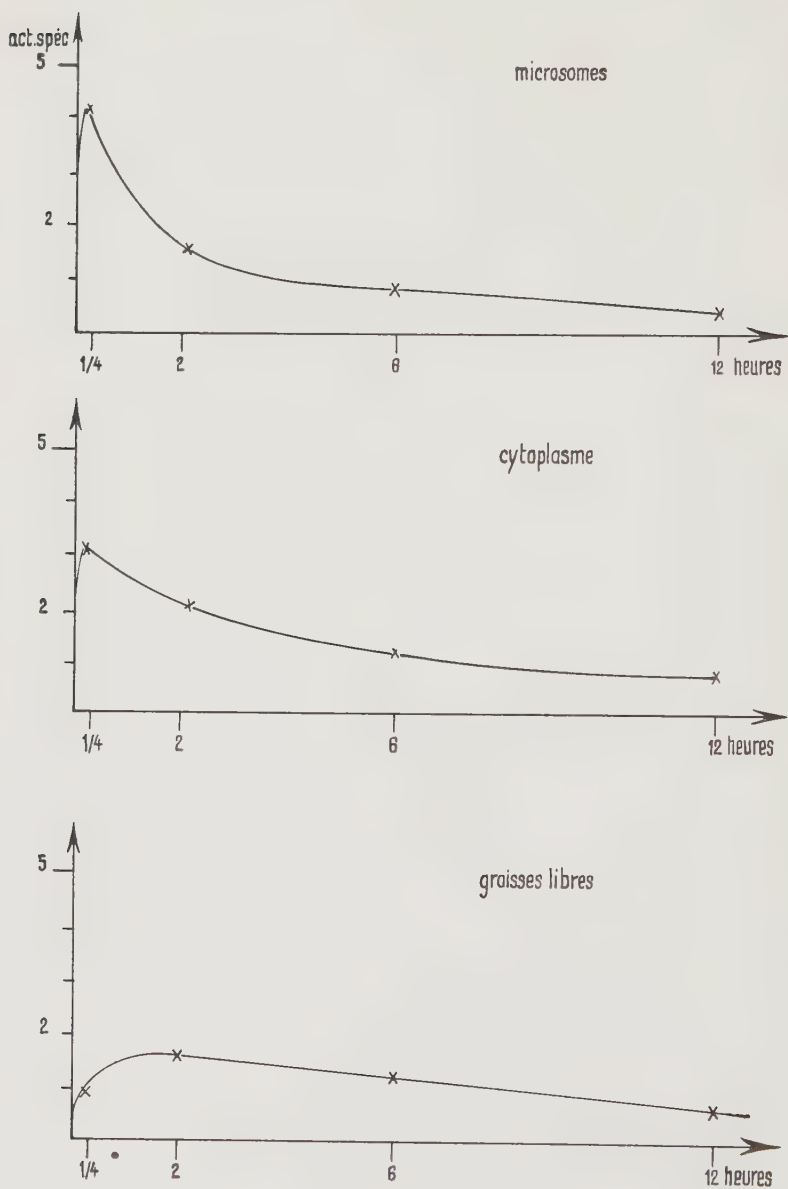
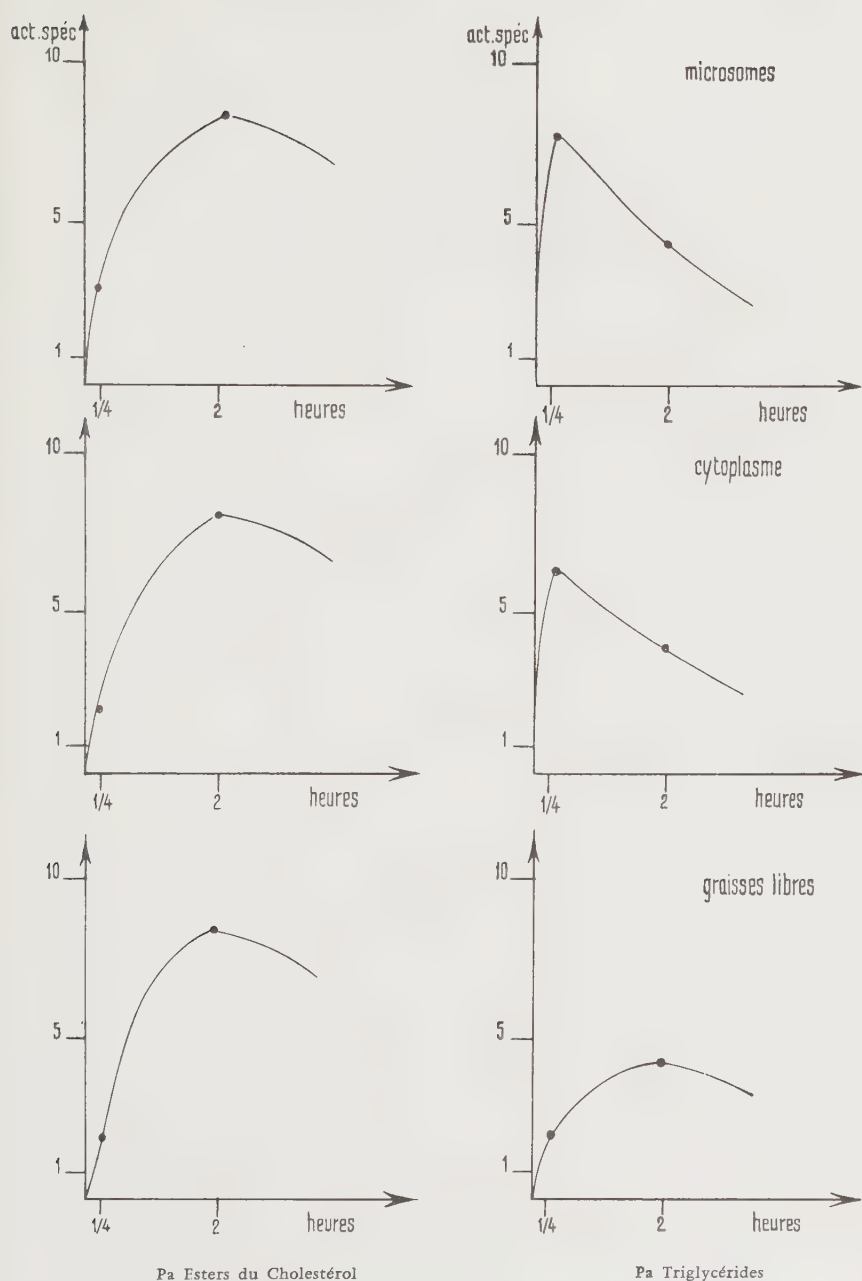


FIG. 16

Incorporation d'acétate ^{14}C dans les acides gras des triglycérides des fractions cellulaires hépatiques.



Pa Esters du Cholestérol

Pa Triglycérides

FIG. 17

Incorporation d'activité ^{14}C dans l'acide palmitique
des fractions cellulaires hépatiques.

TABLEAU XVIII

**Incorporation d'activité ^{14}C dans divers acides gras
des lipides des microsomes hépatiques**

	Temps (en heures)	Activité spécifique	
		Esters de cholestérol	Glycérides
Acide palmitique	1/4	3,97	8,05
	Exp. 1	8,11	4,15
	2 Exp. 2	8,2	5,2
Acide stéarique.	1/4	0,55	2,14
	Exp. 1		0,85
	2 Exp. 2		1,62
Acide oléique ..	1/4	0,64	0,64
	Exp. 1	0,2	0,11
	2 Exp. 2	0,3	0,34

II. — Etude de l'incorporation des acides gras dans les lipides du plasma

Peu de temps, un quart d'heure à une demi-heure, après l'injection d'acétate, nous voyons apparaître dans le plasma une fraction d'acides gras non estérifiés très fortement marqués. Elle est représentée par l'activité spécifique des acides gras des non-phospholipides totaux, par rapport aux activités des acides gras des glycérides et des esters du cholestérol plasmatiques à ces mêmes temps (tableau XX, figure 18).

Une chute rapide de leur marquage, concomitante de celle des acides gras non estérifiés des tissus, foie, poumon, où ils sont synthétisés, est la preuve de leur renouvellement très actif.

A) *Renouvellement de l'acide palmitique dans le palmitate de cholestérol.*

L'acide palmitique imprime par son activité spécifique, très nettement supérieure à celle des acides insaturés, l'allure de l'évolution d'activité spécifique du mélange des acides gras.

L'étude simultanée de l'incorporation de l'acide palmitique ^{14}C dans les glycérides et le palmitate de cholestérol du plasma (fig. 19) indique le maintien à un niveau d'activité supérieur de l'acide palmitique des glycérides.

Soulignons par ailleurs que le maximum d'activité de l'acide palmitique du palmitate de cholestérol plasmatique précède celui du palmitate de cholestérol dans le foie. Il est donc peu vraisemblable que, pour une quantité appréciable, le palmitate de cholestérol plasmatique provienne du foie en tant que molécule entière. Nous sommes conduit à nouveau à l'interprétation d'une estérification du cholestérol dans le plasma lui-même.

B) *Renouvellement de l'acide arachidonique dans l'arachidonate de cholestérol.*

En fonction du temps nous distinguons deux composantes dans la courbe d'évolution de l'activité spécifique des acides gras totaux des esters de cholestérol plasmatiques : nous observons (fig. 20) une estérification lente du cholestérol par l'acide arachidonique nouvellement synthétisé par rapport à celle du palmitate de cholestérol.

C) *L'étude du renouvellement des acides gras dans l'oléate et le linoléate de cholestérol n'était pas accessible par nos expériences*

Nous nous servons des résultats de MEAD et FILLERUP [71] sur la cinétique d'incorporation d'acides gras exogènes pour démontrer que le renouvellement de l'acide oléique, à l'intensité du marquage près, est du même type que celui de l'acide palmitique, tandis que l'acide linoléique et l'acide arachidonique se caractérisent par un renouvellement très lent.

Ces auteurs ont suivi l'incorporation dans les esters de cholestérol du plasma des acides stéarique, oléique et linoléique une, deux, quatre et vingt-quatre heures après leur ingestion. Nous ne retiendrons pas les premiers points expérimentaux, car pour les temps courts (une à quatre heures), les acides gras exogènes présents dans le plasma sont encore pour la plupart confinés dans les chylomicrons qui ne doivent pas être confondus avec les lipoprotéines plasmatiques ; hydrolysés dans le foie, les chylomicrons libéreront des acides gras qui reviendront au plasma avec les lipides hépatiques. Par contre, vingt-quatre heures après l'absorption, les acides gras plasmatiques, qu'ils soient d'origine endogène ou exogène, constituent un ensemble homogène. On constate après vingt-quatre heures une activité élevée de l'acide linoléique des esters du cholestérol, activité croissant depuis les temps courts tandis que l'activité de l'acide oléique est devenue pratiquement nulle.

TABLEAU XIX

Activité spécifique des acides gras des lipides du plasma

Temps (en heures)	Non-phospholipides totaux	Glycérides	Cholestérides
1/4	2,28	1,15	0,11
1/2	4,5	4,05	0,66
1	1,35	1,51	0,79
1 1/2	1,25	1,39	0,68
2	1,73	1,86	0,66
3	0,85	1,75	0,45
6	0,49	0,54	0,40

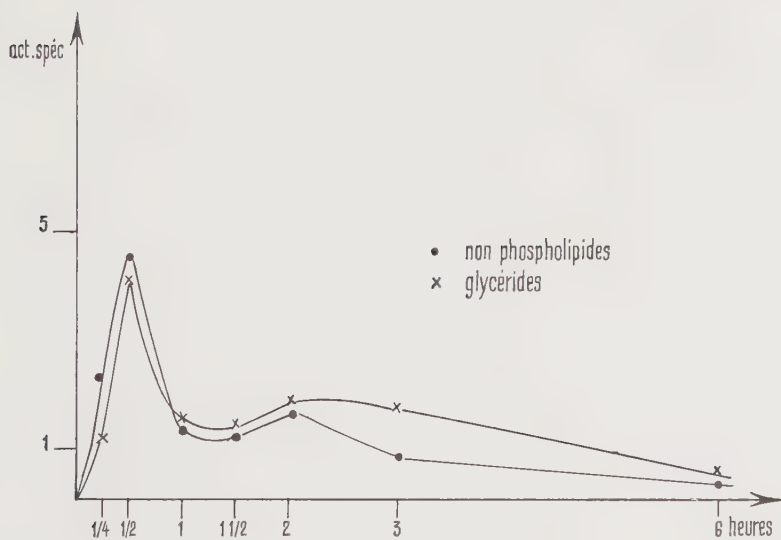
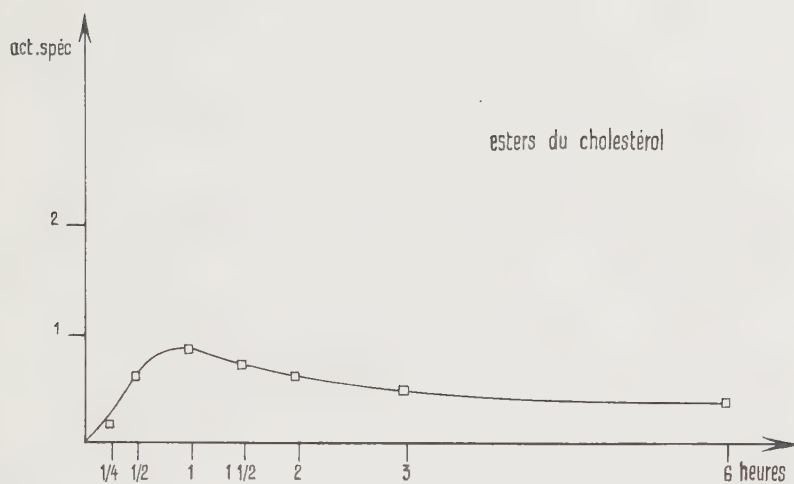


FIG. 18
Incorporation d'acétate ^{14}C dans les acides gras du plasma.

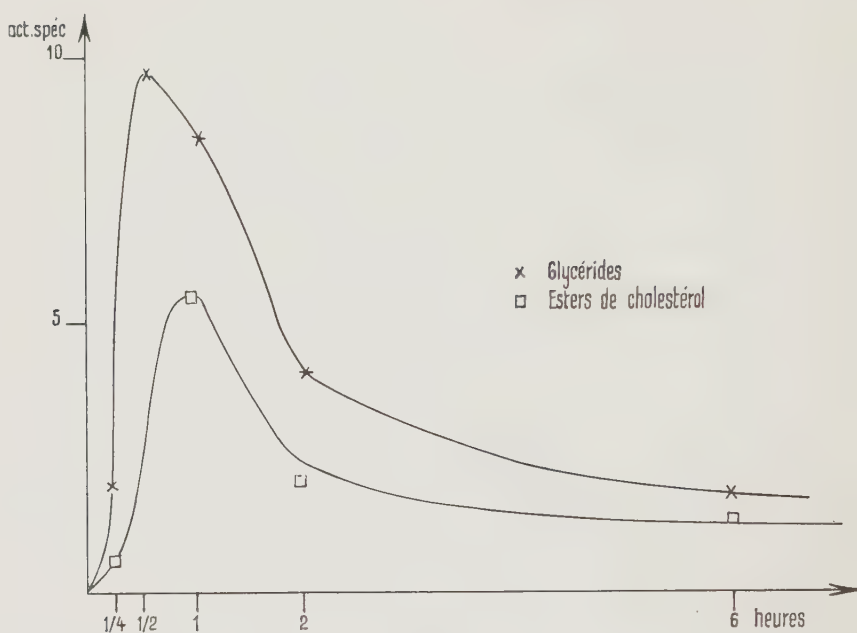


FIG. 19

Evolution de l'activité spécifique de l'acide palmitique dans les glycérides et les esters de cholestérol.

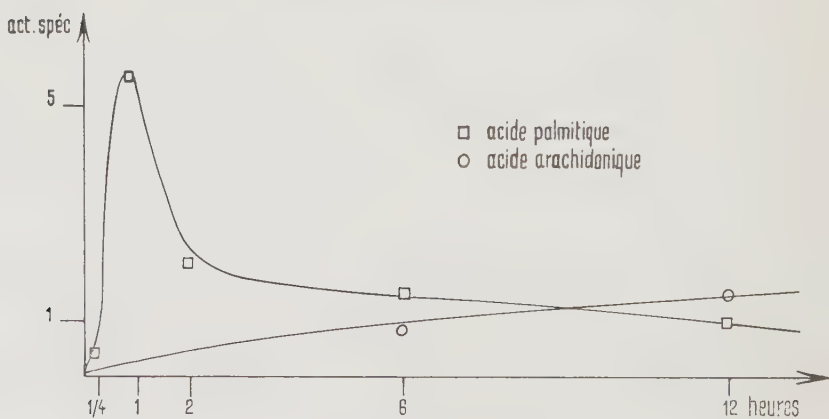


FIG. 20

Evolution comparée des activités spécifiques des acides palmitique et arachidonique des palmitate et arachidonate de cholestérol plasmatiques.

QUATRIÈME PARTIE

INTERPRÉTATION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS

Une interprétation d'ensemble du métabolisme des esters du cholestérol se dégage de l'étude simultanée du renouvellement des acides gras et du cholestérol estérifié.

Dans la cellule hépatique, le cholestérol estérifié s'échange avec le cholestérol libre dans chacune des diverses structures cellulaires, car il y acquiert un niveau d'activité proportionnel à celui de son précurseur, le cholestérol libre de la structure. En ce qui concerne les acides gras, nous observons une vitesse de renouvellement de l'ordre de dix fois plus rapide que celle du cholestérol qui les estérifie. Le cholestérol hépatique se renouvelle donc dans les esters par échange lent, une molécule servant à l'estérification de plus de dix molécules d'acides gras qui eux sont rapidement libérés par hydrolyse. Ce mode de renouvellement confirme l'existence d'un métabolisme des esters du cholestérol à l'intérieur du foie relativement indépendant de celui des esters du cholestérol plasmatiques, le transfert au plasma ne pouvant se faire, pour une part importante d'entre eux, sous forme de molécule entière. Cette interprétation nous était déjà imposée par la simple comparaison de la nature des acides gras des esters du cholestérol plasmatiques et hépatiques. Ces faits excluent l'existence dans le foie d'un « pool » d'esters du cholestérol dont dériveraient directement ceux présents dans le plasma.

Dans le plasma, les esters du cholestérol constituent une fraction quantitativement importante des lipides des lipoprotéines. On est conduit à se demander quelle est l'origine de ces molécules complexes. Certains auteurs, ayant observé la sécrétion par des coupes de foie, dans le plasma où elles baignent, soit d' α lipoprotéines (RADDING et STEINBERG) [75], soit de β lipoprotéines (MARSH et WHEREAT) [76], ont pensé que ces lipoprotéines sont synthétisées comme telles dans le foie. Retenant cette hypothèse, nous admettrons avec OLSON [77] que la synthèse peut avoir lieu au niveau de la membrane cellulaire et que les molécules formées passent

immédiatement dans le sang circulant. Il s'ensuit que leur concentration hépatique toujours minime empêcherait de les atteindre et de mesurer leur vitesse de renouvellement dans le tissu. Dès lors, nous pouvons admettre que les esters du cholestérol existant dans ces diverses lipoprotéines se forment en leur sein à partir d'acides gras provenant notamment des phospholipides et des glycérides par transestérification. Ainsi prendrait naissance, dans la cellule hépatique, une catégorie d'esters du cholestérol spécifique, différant nettement de l'ensemble des esters du cholestérol hépatiques par la nature des acides gras.

Les données expérimentales sur le renouvellement du cholestérol et des acides gras des esters de cholestérol plasmatiques conduisent à une synthèse au sein même du plasma, plutôt qu'à une origine hépatique. En effet, la part la plus importante du cholestérol estérifié plasmatique dérive du cholestérol libre du plasma. Le maximum d'activité spécifique observé pour les acides gras des esters de cholestérol dans le plasma précède, dans le temps, le maximum d'activité des acides gras des esters de cholestérol hépatiques. Une forte activité spécifique à la deuxième heure des acides gras des esters de cholestérol hépatiques ne se reflète pas dans ceux du plasma.

Examinons plus précisément l'origine plasmatique des acides gras estérifiant le cholestérol. Préférentiellement les acides gras des esters de cholestérol dériveraient des phospholipides et des glycérides plasmatiques par transestérification.

Si l'on envisage l'acide arachidonique, comptant pour 27 % des acides gras des esters de cholestérol, c'est dans les phospholipides qu'on doit rechercher son origine, puisque les triglycérides en sont dépourvus. *In vitro*, le phénomène de transestérification lécithines-esters de cholestérol a été observé par de nombreux auteurs, ce qui rend très probable l'existence de ce mécanisme *in vivo*. C'est au contraire dans les triglycérides qu'on doit rechercher l'origine de l'acide linoléique. On connaît le rôle des glycérides plasmatiques comme transporteurs d'acide linoléique depuis le tissu adipeux (E. LE BRETON, M. PASCAUD [78] et M. HORNING [79]), où il est stocké. La teneur élevée du plasma en linoléate de cholestérol pourrait provenir d'une transestérification avec les glycérides.

Il ressort de nos expériences que le renouvellement des esters du cholestérol plasmatiques est lent par rapport à celui de ce lipide dans le foie. Renouvellement lent pour les acides gras, plus lent encore pour le cholestérol. Tenant compte des observations d'autres auteurs, nous avons montré que le renouvellement lent des acides gras totaux des esters de cholestérol plasmatiques est la résultante du renouvellement de deux fractions d'acides gras ; l'une, dont le renouvellement est le plus rapide, représente les acides palmitique et oléique (50 % des acides gras totaux de ces esters), l'autre est constituée par les acides polyinsaturés à renouvellement extrêmement lent.

L'étude du renouvellement du cholestérol des esters de cholestérol plasmatiques conduit également à l'existence de deux fractions à renouvellement différents.

En effet, l'activité spécifique du cholestérol estérifié atteint dans nos expériences un plateau d'activité ; ce palier indique l'accroissement d'activité d'une composante à renouvellement lent (quantitativement non distinguable de l'ensemble). Il nous semble que les deux composantes possibles de cette courbe d'évolution de l'activité spécifique du cholestérol estérifié pourraient correspondre aux deux composantes de la courbe d'évolution des acides gras. Ainsi, les esters de cholestérol plasmatiques comprendraient deux fractions distinctes l'une, palmitate et oléate de cholestérol, à renouvellement rapide ; l'autre, arachidonate et linoléate de cholestérol, à renouvellement lent.

Une des conclusions présentant un intérêt général, qui selon nous peut se dégager de cette étude, concerne la forme sous laquelle le cholestérol est engagé dans les lipoprotéines solubles plasmatiques ou les liporibonucléoprotéines des membranes microsomiales. Ces dernières sont très riches en cholestérol libre (nous n'y avons trouvé que de très faibles quantités d'esters), alors que les lipoprotéines plasmatiques de densité élevée, riches en protéines et en phospholipides, contiennent une proportion élevée d'esters du cholestérol.

Nous savons que le rapport $\frac{\text{chol. estérifié}}{\text{chol. libre}}$ croît lorsque la densité des lipoprotéines augmente. Toutefois, malgré leur

forte teneur en esters de cholestérol, les fractions lipoprotéiques à haute densité, sélectivement séparées, contiennent toujours une certaine fraction de cholestérol libre. D'après l'analyse en acides gras de chacun des constituants lipidiques des diverses lipoprotéines sériques humaines, LINDGREN [80] entrevoit une tendance à l'insaturation progressive des acides gras allant des β lipoprotéines aux α lipoprotéines denses. Il est vraisemblable que, chez le rat également, les esters de cholestérol des lipoprotéines de densité élevée sont riches en acides polyinsaturés. La particularité de ces acides gras chez le rat est leur forte teneur en acide arachidonique. Si les esters de cholestérol jouent par leur polarité un rôle dans la structure des lipoprotéines, le caractère polaire ne peut être dû qu'au nombre élevé de doubles liaisons de la chaîne aliphatique. Les sites de valences insaturées, par leurs électrons disponibles, seraient susceptibles d'établir des liaisons avec les électrons disponibles des molécules de protéines ou de phospholipides.

Le cholestérol libre, à la fois dans les structures cellulaires membranaires et dans les lipoprotéines plasmatiques, se renouvelle très rapidement. On pourrait rapporter ce caractère à une localisation superficielle dans ces diverses lipoprotéines complexes, le cholestérol estérifié à renouvellement lent ayant au contraire, une position interne.

CONCLUSION

L'étude du métabolisme du cholestérol libre et de ses esters telle que nous l'avons envisagée, c'est-à-dire, la recherche des lieux de synthèse et d'estérification dans les ultrastructures de la cellule hépatique, ainsi que la détermination des échanges entre ces diverses structures et le plasma, a nécessité de connaître le renouvellement moléculaire à la fois du cholestérol et des acides gras.

Nous avons dû apporter une technique de séparation chromatographique sur colonne d'alumine des esters de cholestérol purs, applicable à différents milieux biologiques où la proportion des esters de cholestérol est très variable, allant jusqu'à des proportions aussi faibles que 5 ‰. Les modalités de cette technique sont décrites dans la première partie de notre mémoire.

Nous avons ensuite, à l'aide du marquage au ^{14}C , établi la cinétique de l'incorporation de l'acétate simultanément dans le cholestérol et dans les acides gras, ceci jusqu'à la douzième heure après l'injection du précurseur radioactif. Le choix de ces temps courts nous a permis de comparer les activités de synthèse, en phase croissante de l'activité spécifique, et d'étudier les relations entre précurseurs et dérivés. La phase de décroissance d'activité nous a permis, au contraire, de calculer les vitesses de renouvellement.

Renouvellement du cholestérol.

La deuxième partie de notre exposé concerne le métabolisme du cholestérol libre et du cholestérol estérifié dans le foie et dans le plasma.

— Nous observons que le renouvellement du cholestérol libre du foie entier a une composante rapide d'environ trente-six heures. Cependant, nous précisons que le renouvellement du cholestérol dans le foie n'est pas homogène et nous étudions plus particulièrement les fractions métaboliques correspondant aux diverses structures cellulaires.

Nous démontrons que, dans le foie, le cholestérol est synthétisé non seulement par les membranes microsomiales mais aussi par les mitochondries et par les noyaux. L'activité synthétisante, représentée par l'activité spécifique du cholestérol libre dans le premier quart d'heure après injection du précurseur acétate, suit un ordre croissant allant des microsomes aux mitochondries et aux noyaux ; l'activité spécifique du cholestérol cytoplasmique est inférieure de 30 % à celle des microsomes.

Le passage dans le cytoplasme du cholestérol libre nouvellement synthétisé par les microsomes est rapide, l'équilibre étant atteint vers la deuxième heure ; ce cholestérol pénètre par contre très lentement dans les graisses libres. Le fait que les courbes d'évolution d'activité spécifique relatives aux microsomes et au cytoplasme deviennent confondues indique qu'il n'y a pas seulement transfert vers le cytoplasme mais échanges entre les molécules de cholestérol des deux fractions.

Par ailleurs, le fait que la décroissance d'activité du cholestérol des microsomes est très lente, alors que nous leur connaissons une activité synthétisante élevée et un renouvellement rapide, nous permet de mettre en évidence l'importance d'un renouvellement par échange rapide avec une fraction de cholestérol fortement marqué. Il s'ensuit que les mesures de décroissance d'activité concernant le cholestérol microsomial et le cholestérol cytoplasmique ne permettent pas de calculer les quantités en échanges.

— D'après la comparaison des niveaux d'activité spécifique, le cholestérol libre des graisses surnageantes de la cellule hépatique ne peut être précurseur du cholestérol plasmatique.

Au total, 80 % du cholestérol libre plasmatique sont en échange rapide avec le foie, 20 % en échange plus lent avec le cholestérol d'autres tissus et avec le cholestérol estérifié plasmatique. La quantité de cholestérol libre plasmatique renouvelée rapidement par échange avec le foie est de 1 mg/h environ, soit l'équivalent de la totalité du cholestérol libre contenu dans le plasma de l'animal.

— En ce qui concerne le cholestérol estérifié hépatique, il trouve son origine dans le cholestérol libre du même organe.

Chacune des structures cellulaires estérifie pour sa part le cholestérol libre *in situ*.

— De même, dans le plasma, la part la plus importante du cholestérol estérifié provient d'une estérification du cholestérol libre au sein des lipoprotéines plasmatiques et non d'un transfert des molécules d'esters du cholestérol en provenance du foie ou des surrénales.

Acides gras des esters de cholestérol.

Dans la troisième partie de notre thèse nous avons recherché dans les divers lipides, d'après leur nature et leur renouvellement, l'origine des acides gras précurseurs des esters du cholestérol hépatiques et plasmatiques.

Nous avons observé une variabilité de composition en acides gras des esters de cholestérol d'origines tissulaire et plasmatique contrastant avec l'uniformité de composition des glycérides de tous les tissus.

Les esters du cholestérol du plasma diffèrent de ceux des tissus, à l'exception de ceux des surrénales, par leur richesse en acides polyéniques : 48 % (dont 16 de linoléique et 27 d'arachidonique), contre 12 % environ dans le foie, et 33 % dans les surrénales. Un fait cependant les caractérise toujours, leur faible pourcentage en acides gras saturés, environ 20 %, dont 13 à 15 d'acide palmitique et 3 à 9 d'acide stéarique. Les acides gras insaturés atteignent au total 80 %.

La composition moyenne observée pour les esters du cholestérol extraits du foie entier se retrouve au niveau des différentes structures cellulaires hépatiques, ainsi que dans les graisses libres surnageantes, non liées aux protéines hépatiques.

La seule nature des acides gras permet d'exclure l'ensemble des esters de cholestérol hépatiques comme précurseur des esters de cholestérol plasmatiques. Par contre, elle pourrait suggérer l'existence de relations entre les esters de cholestérol des surrénales et du plasma ; en fait nous avons observé, par le marquage du cholestérol, que normalement les surrénales ne déversent pas des quantités mesurables d'esters du cholestérol dans le plasma.

Renouvellement des acides gras.

L'incorporation d'acétate ^{14}C dans les acides gras du foie nous a permis de calculer que 25 % environ des acides gras des esters du cholestérol sont renouvelés par heure, ainsi que 20 % des acides gras des triglycérides.

Seul l'acide palmitique est fortement marqué. En valeur absolue, les activités spécifiques des acides oléique et polyinsaturés sont très faibles et difficilement mesurables. L'acide palmitique imprime donc l'allure d'ensemble de l'incorporation, figurée par l'évolution d'activité spécifique des acides gras totaux.

L'acide palmitique est incorporé beaucoup plus rapidement dans les triglycérides des ultrastructures hépatiques que dans les triglycérides des graisses libres. Au contraire, nous observons pour le palmitate de cholestérol des vitesses moyennes identiques dans les divers compartiments cellulaires.

Le renouvellement lent des acides gras des cholestérides plasmatiques se fait de préférence par transestérification, pour une part avec les glycérides, et pour l'arachidonate de cholestérol spécifiquement avec les phospholipides. Nous observons un renouvellement de l'acide palmitique du palmitate de cholestérol plus rapide que celui de l'acide arachidonique de l'arachidonate de cholestérol.

La quatrième partie de notre exposé est consacrée à une interprétation d'ensemble permise par l'étude simultanée du métabolisme du cholestérol et des acides gras des esters du cholestérol.

Dans le foie, le renouvellement des acides gras des esters du cholestérol, dix fois supérieur à celui du cholestérol qui les estérifie, est analogue au renouvellement des acides gras des autres lipides.

Dans le plasma, alors qu'il en est de même pour l'acide palmitique, le renouvellement de l'acide arachidonique est beaucoup plus lent. On est conduit à l'interprétation : les esters de cholestérol comprennent deux fractions, l'une palmitate (et oléate) à renouvellement rapide, l'autre arachidonate (et linoléate) à renouvellement lent. La signification physiologique de ces deux types d'esters reste à découvrir.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BOUDET (1883) : *Ann. Chim. Phys.*, L 11, 337.
- [2] HÜRTLE K. (1896) : *Hoppe Seiler's Zschr. Phys. Che.*, 21, 331.
- [3] BLOOR W.R., BLACK A.G., BULLENS S. (1938) : *J. Allergy*, 9, 227.
- [4] KELSEY E., LONGENECKER H.E. (1941) : *J. Biol. Chem.*, 139, 727.
- [5] TRAPPE W. (1940) : *Biochem. Z.*, 305, 150 - 306, 316 - 307, 97.
- [6] BORGSTRÖM B. (1952) : *Acta Physiol. Scandin.*, 25, 111.
- [7] FILLERUP D.L., MEAD J.F. (1953) : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 83, 574.
- [8] CLEMENT G., CLEMENT J., LOUEDEC A. (1954) : *Arch. Sc. Physiol.*, 8, 233.
- [9] CAHN T., HOUGET J. (1935) : *C.R. Acad. Sci.*, 201, 166.
- [10] FAVARGER P. (1946) : *Arch. intern. Pharmacodynamie*, 72, 1.
- [11] POPJAK G. (1946) : *Biochem. J.*, 40, 608.
- [12] WOODWARD R.B., BLOCH K. (1953) : *J. Amer. Chem. Soc.*, 75, 2023-24.
- [13] CORNFORTH J.W. (1955) : *Biosynthesis of Cholesterol. Rvs Pure and Appl. Chem. (Australia)*, 4, 275-302.
- [14] TAVORMINA P.A., GIBBS M.N. (1956) : *J. Amer. Chem. Soc.*, 78, 4498-99, 6210.
- [15] ZILVERSMIT D.B. (1960) : *Amer. J. Med.*, 29, 5, 832.
- [16] POPJAK G. (1960) : *Advances in Enzymology*, 22, 281.
- [17] BUCHER N.R.L., Mc GARRAHAN K. (1956) : *J. Biol. Chem.*, 222, 1.

Renouvellement des acides gras.

L'incorporation d'acétate ^{14}C dans les acides gras du foie nous a permis de calculer que 25 % environ des acides gras des esters du cholestérol sont renouvelés par heure, ainsi que 20 % des acides gras des triglycérides.

Seul l'acide palmitique est fortement marqué. En valeur absolue, les activités spécifiques des acides oléique et polyinsaturés sont très faibles et difficilement mesurables. L'acide palmitique imprime donc l'allure d'ensemble de l'incorporation, figurée par l'évolution d'activité spécifique des acides gras totaux.

L'acide palmitique est incorporé beaucoup plus rapidement dans les triglycérides des ultrastructures hépatiques que dans les triglycérides des graisses libres. Au contraire, nous observons pour le palmitate de cholestérol des vitesses moyennes identiques dans les divers compartiments cellulaires.

Le renouvellement lent des acides gras des cholestérides plasmatiques se fait de préférence par transestérification, pour une part avec les glycérides, et pour l'arachidonate de cholestérol spécifiquement avec les phospholipides. Nous observons un renouvellement de l'acide palmitique du palmitate de cholestérol plus rapide que celui de l'acide arachidonique de l'arachidonate de cholestérol.

La quatrième partie de notre exposé est consacrée à une interprétation d'ensemble permise par l'étude simultanée du métabolisme du cholestérol et des acides gras des esters du cholestérol.

Dans le foie, le renouvellement des acides gras des esters du cholestérol, dix fois supérieur à celui du cholestérol qui les estérifie, est analogue au renouvellement des acides gras des autres lipides.

Dans le plasma, alors qu'il en est de même pour l'acide palmitique, le renouvellement de l'acide arachidonique est beaucoup plus lent. On est conduit à l'interprétation : les esters de cholestérol comprennent deux fractions, l'une palmitate (et oléate) à renouvellement rapide, l'autre arachidonate (et linoléate) à renouvellement lent. La signification physiologique de ces deux types d'esters reste à découvrir.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BOUDET (1883) : *Ann. Chim. Phys.*, L 11, 337.
- [2] HÜRTLE K. (1896) : *Hoppe Seiler's Zschr. Phys. Che.*, 21, 331.
- [3] BLOOR W.R., BLACK A.G., BULLENS S. (1938) : *J. Allergy*, 9, 227.
- [4] KELSEY E., LONGENECKER H.E. (1941) : *J. Biol. Chem.*, 139, 727.
- [5] TRAPPE W. (1940) : *Biochem. Z.*, 305, 150 - 306, 316 - 307, 97.
- [6] BORGSTRÖM B. (1952) : *Acta Physiol. Scandin.*, 25, 111.
- [7] FILLERUP D.L., MEAD J.F. (1953) : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 83, 574.
- [8] CLEMENT G., CLEMENT J., LOUEDEC A. (1954) : *Arch. Sc. Physiol.*, 8, 233.
- [9] CAHN T., HOUGET J. (1935) : *C.R. Acad. Sci.*, 201, 166.
- [10] FAVARGER P. (1946) : *Arch. intern. Pharmacodynamie*, 72, 1.
- [11] POPJAK G. (1946) : *Biochem. J.*, 40, 608.
- [12] WOODWARD R.B., BLOCH K. (1953) : *J. Amer. Chem. Soc.*, 75, 2023-24.
- [13] CORNFORTH J.W. (1955) : *Biosynthesis of Cholesterol. Rvs Pure and Appl. Chem. (Australia)*, 4, 275-302.
- [14] TAVORMINA P.A., GIBBS M.N. (1956) : *J. Amer. Chem. Soc.*, 78, 4498-99, 6210.
- [15] ZILVERSMIT D.B. (1960) : *Amer. J. Med.*, 29, 5, 832.
- [16] POPJAK G. (1960) : *Advances in Enzymology*, 22, 281.
- [17] BUCHER N.R.L., Mc GARRAHAN K. (1956) : *J. Biol. Chem.*, 222, 1.

- [18] CHEVALLIER F. (1956) : Arch. Sc. Physiol., 10, 4, 321.
- [19] COOK R.P. (1958) : Cholesterol, 145 (Academic Press).
- [20] HUTCHENS T.T., VAN BRUGGEN J.T., WEST E.S. (1954): Arch. Biochem. Biophys., 52, 261.
- [21] BERGSTROM S., DANIELSON N.H., SAMUELSON B. (1960): Lipide Metabolism (ed. K. BLOCH), 291.
- [22] GOULD R.G. (1955) : In Symposium on Atherosclerosis 153-168, Nat. Res. Council, Washington D.C.
- [23] FRANTZ I.D., SCHNEIDER H.S., HINKELMAN B.T. (1954): J. Biol. Chem., 206, 465.
- [24] GOULD R.G., POPJACK G. (1957) : Biochem. J., 66, 51 P.
- [25] RITTENBERG D. SCHOENHEIMER R. (1937) : J. Biol. Chem., 121, 235-253.
- [26] POPJAK G., BEECKMANS M.L. (1950) : Biochem. J., 47, 233-238.
- [27] PILH A., BLOCH K., ANKER H.S. (1950) : J. Biol. Chem., 183, 441-450.
- [28] VAN BRUGGEN J.T., HUTCHENS T.T., CLAYCOMB C.K., WEST E.S. (1953) : J. Biol. Chem., 200, 1, 31.
- [29] WONG R.K.L., VAN BRUGGEN J.T. (1960) : J. Biol. Chem., 235, 1, 30.
- [30] LANDON E.J., GREENBERG D.M. (1954) : J. Biol. Chem., 209, 493.
- [31] SWELL L., TROUT E.C., TREADWELL C.R. (1958) : J. Biol. Chem., 230, 631.
- [32] GOULD R.G. (1951) : Amer. J. Med., 11, 209.
- [33] HARPER P.V., NEAL W.B., HLAVACEK G.R. (1953) : Metabolism, 2, 1, 69.
- [34] ECKLES N.E., TAYLOR C.B., CAMPBELL D.J., GOULD R.G. (1955) : J. Lab. Clin. Med., 46, 359.

- [35] GOULD R.G., LEROY G.V. (1955) : *J. Lab. Clin. Med.*, **46**, 374-384.
- [36] FRIEDMAN M., BYERS S.O. (1954) : *Circulation*, **10**, 491.
- [37] ZILVERSMIT D.B. (1961) : *Exp. ann. Biochimie Med.*, **23**, 1.
- [38] BIGGS M.W. (1957) : *Advanc. Biol. Med. Phys.*, **5**, 357.
- [39] BORGSTRÖM B., LINDHE B.A., WLODAWER P. (1958) : *Proc. Soc. exp. Biol.*, **99**, 365.
- [40] BRAGDON J.H., GORDON R.S. (1958) : *J. Clin. Inves.*, **37**, 574.
- [41] GOODMAN S.D. (1962) : *J. of Clin. Inves.*, **41**, 10, 1886.
- [42] CLÉMENT G., CLÉMENT J., LE BRETON E., PASCAUD M., TUBIANA M. (1953) : *Jour. de Physiologie*, **45**, 76-78.
- [43] CHEVALLIER F., MAURICE J.-P. (1961) : *Bull. Sté Chim. Biol.*, **43**, 5-6, 827-840.
- [44] FREDRICKSON D.S. (1956) : *J. Biol. Chem.*, **222**, 109.
- [45] FREDRICKSON D.S., MCCOLLESTER D.L., HAVEL R.J., ONO K. (1958) : *Chemistry of Lipides Related to Atherosclerosis* (ed. I. PAGE), 213.
- [46] SPERRY W.H., STOYANOFF V.A. (1958) : *J. Biol. Chem.*, **126**, 77-89.
- [47] LE BRETON A., PANTALÉON J. (1947) : *Arch. Sc. Physiol.*, **1**, 63-80, 199-217.
- [48] SWELL L., TREADWELL C.R. (1950) : *J. Biol. Chem.*, **185**, 349-355.
- [49] WAGNER A., ROGALSKI L. (1952) : *J. Lab. Clin. Med.*, **40**, 324-334.
- [50] MUKERJEE S., KUNITAKE G., ALFIN-SLATER R.B. (1958) : *J. Biol. Chem.*, **230**, 91.

- [51] CHAUVEAU J., CLÉMENT G., CLÉMENT J., LE BRETON E. (1951) : Arch. Sc. Phys., 5, 305.
- [52] PASCAUD M. (1963) : Bull. Sté Chim. Biol. (à paraître).
- [53] CHAUVEAU J., CLÉMENT G. (1951) : C.R. Acad. Sci., 232, 2144.
- [54] CHAUVEAU J. (1960) : Ann. Nutr., 14, 4, 37.
- [55] MORRIS L.J. : Communication personnelle.
- [56] MALINS D.C., MANGOLD H.K. (1960) : J. Amer. Oil. Chemist's Soc., 37, 576.
- [57] PIKAAR N.A., NIJHOF J. (1958) : Biochem. J., 70, 1, 52.
- [58] JAMES A.T., MARTIN A.J.P. (1956) : Biochem. J., 63, 1, 144.
- [59] JAMES A.T. (1960) : In Methods of Biochem. Analysis, 8 (ed. D. GLICK).
- [60] PASCAUD M. (1963) : J. Chromat., 10, 125-130.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Le rôle du groupe SH dans les enzymes protéolytiques

Vu et approuvé :

Paris, le 26 Mai 1963

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

M. ZAMANSKY

Vu et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean ROCHE

S O C I P E
P A R I S
N O R D 61-55

4664

